# Enzymatische Untersuchungen zur Verwertung N-haltiger Substanzen durch Hydrogenomonas

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Johannes Krämer

aus Hamm/Westfalen

Göttingen 1968

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544311_0011

# Enzymatische Untersuchungen zur Verwertung N-haltiger Substanzen durch Hydrogenomonas

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Johannes Krämer

aus Hamm/Westfalen

Göttingen 1968

Diese Arbeit wurde im Institut
für Mikrobiologie der Universität
Göttingen durchgeführt.

D 7

Referent: Prof. Dr. H.G.Schlegel
Korreferent: Prof. Dr. A.Trebst

Tag der mündlichen Prüfung: 24. 10. 1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis


| | Seite |
|---|---|
| A. Einleitung | 1 |
| B. Experimente und Ergebnisse | |
| I. Einfluß von Stickstoffquellen auf die Verwertung von Harnstoff, Glutamat und Ammoniak | 3 |
| 1. Harnstoffverwertung | 3 |
| a) Repression der Ureasebildung durch komplexe N-Quellen und Ammoniak | 4 |
| b) Prüfung auf Ureasebildung unter N-Mangelbedingungen | 7 |
| c) Ureasenachweis auf herkömmlichen und modifizierten Indikatornährböden | 9 |
| d) Isolierung und Charakterisierung von transportgeschädigten Hydrogenomonas H16-Mutanten | 13 |
| 2. Bildung und Verwertung von Glutamat durch Hydrogenomonas H16 | 16 |
| a) Nachweis einer NAD- und einer NADP-spezifischen Glutamat-Dehydrogenase | 16 |
| b) Einfluß von Glutamat, Ammoniumchlorid und N-Mangelbedingungen auf die Bildung der Urease, der Glutamat-Dehydrogenase und der Glutamin-Synthetase | 20 |
| c) Einfluß von Wasserstoff auf die Glutamatverwertung | 27 |
| II. Verwertung von Pyrimidinen durch Knallgasbakterien | 31 |
| 1. Verwertung von Cytosin und Uracil durch Hydrogenomonas H16 und Hydrogenomonas facilis | 31 |
| a) Nutzung von Cytosin als N-Quelle durch Hydrogenomonas H16 und H. facilis | 33 |

Seite

b) Ausscheidung von Uracil durch Hydrogenomonas H16 während des Wachstums mit Cytosin 35
c) Verfahren zur Bestimmung der Cytosin-Desaminase 36
d) Induktive Bildung der Cytosin-Desaminase bei Hydrogenomonas H16 38

2. Abbau von Uracil durch H. facilis 40

a) Substratverwertung 44
b) Substratoxidation 44
c) Papierchromatographische Identifizierung der Intermediärprodukte 46

3. Untersuchungen zur Regulation des Pyrimidinabbaues bei H. facilis 49

a) Oxidation von Pyrimidinderivaten und Intermediärprodukten des Uracilabbaues 49
b) Nachweis von Cytosin-Desaminase, Dihydrouracil-Dehydrogenase und Dihydrouracil-Hydrase 53
c) Induktive Bildung der Enzyme 55

4. Defektmutanten von H. facilis 59

a) Mutationsauslösung und Anreicherung 60
b) Verwertung von Cytosin und Ausscheidungsprodukte 63

5. Abbau von Uracil, Thymin und Orotsäure durch den Wildstamm und durch Defektmutanten von H. facilis 66

Seite

C. Diskussion 71

1. Harnstoffverwertung 71
2. Glutamat- und Ammoniakverwertung 74
3. Pyrimidinverwertung 78

Zusammenfassung 83

Methoden 86

Literatur 100

Abkürzungen

| | |
|---|---|
| ATP | Adenosin-5'-triphosphorsäure |
| α-KGS | α-Ketoglutarsäure |
| CY-DA | Cytosin-Desaminase |
| DHU | Dihydrouracil |
| DNS | Desoxyribonucleinsäure |
| E. | Escherichia |
| EDTA | Äthylendiamintetraacetat |
| FM | Fructose-Mineralmedium |
| GluDH | Glutamat-Dehydrogenase |
| $GluNH_2$-S. | Glutamin-Synthetase |
| (g/v) | Masse(in Gramm) pro Volumeneinheit |
| H. | Hydrogenomonas |
| HE | Hefeextrakt |
| M. | Micrococcus |
| NAD(P) | Nicotinamid-adenin-dinucleotid (phosphat) |
| $NAD(P)H_2$ | reduziertes NAD(P) |
| NB | Nutrient Broth |
| NL | Nährlösung |
| NMG | 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin |
| P. | Pseudomonas |
| Pc. | Penicillin |
| RNS | Ribonucleinsäure |
| 3-UP | 3-Ureidopropionsäure |
| TCE | Trichloressigsäure |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UV | ultraviolettes Licht |
| (v/v) | Volumeneinheit pro Volumeneinheit |

## A. EINLEITUNG

Unter den Stickstoffverbindungen, die am Zellstoffwechsel beteiligt sind, kommt dem Ammoniak eine zentrale Stellung zu. Nur das Ammoniak kann als anorganische Stickstoffquelle direkt assimiliert werden; andere Stickstoffverbindungen wie molekularer Stickstoff, Nitrat oder Nitrit werden vor dem Einbau in organisches Zellmaterial bis zur Stufe des Ammoniaks reduziert. Bei Mineralisationsprozessen im Boden und in den Gewässern werden die in der Natur vorkommenden organischen Stickstoffverbindungen zu Ammoniak abgebaut. Im Stickstoffkreislauf der Natur sind die Ammonifikationsprozesse von besonderer Bedeutung. In der lebenden Zelle liegt der überwiegende Teil des gebundenen Stickstoffes als Protein vor und annähernd 10% sind Bestandteil der Nucleinsäuren. Nach dem Absterben der tierischen und pflanzlichen Organismen, werden diese hochpolymeren Stoffe bis zu Ammoniak abgebaut, das dann als N-Quelle erneut zur Assimilation verfügbar ist.

Die Fähigkeit, Purin- und Pyrimidinbasen abzubauen, ist offenbar bei Bakterien weit verbreitet. Clostridium cylindrosporum und Clostridium acidi-urici bauen die Purine, Clostridium oroticum und Clostridium uracilicum die Pyrimidine auf reduktivem Wege ab. Aerobe Mikroorganismen dagegen vollziehen vorwiegend einen oxidativen Abbau dieser Verbindungen; dabei wird Harnstoff frei, der durch die Urease hydrolysiert wird.

Das Ammoniak, das beim Protein- und Nucleinsäureabbau freigesetzt wird, kann von der Bakterienzelle leicht aufgenommen und zu Synthesen verwendet werden. Bei der Überführung des Ammoniaks in organische Verbindungen haben offenbar nur diejenigen Reaktionen physiologische Bedeutung, die durch die Glutamat-Dehydrogenase und durch die Glutamin-Synthetase katalysiert werden. Diese Enzyme sind wegen ihrer zentralen Stellung im Stickstoffhaushalt in den letzten Jahren eingehend

untersucht worden. Die Glutamat-Dehydrogenase kommt in tierischen und menschlichen Geweben, in höheren Pflanzen, in Pilzen und in Bakterien vor. Sie ist nicht nur für die Assimilation des Ammoniaks verantwortlich, sondern auch für die dissimilatorische Nutzung von Glutaminsäure.

Die Untersuchungen an der Urease an Hydrogenomonas H16 (KÖNIG et al. 1966) hatten gezeigt, daß die Bildung dieses Enzyms nicht durch Harnstoff induziert wird, sondern einer Repression durch die N-Quellen des Mediums unterliegt. Bei diesem Organismus wird Urease nur in Abwesenheit einer äußeren Stickstoffverbindung gebildet. In diesem Zusammenhang ergab sich die Frage, ob auch andere Ammoniak freisetzende oder Ammoniak bindende Enzyme bei dem untersuchten Stamm Hydrogenomonas H16 einer vergleichbaren Beeinflussung durch die Stickstoffquellen des Mediums unterliegen.

Von den Ammoniak freisetzenden Enzymen wurden in der vorliegenden Arbeit die Urease, die Glutamat-Dehydrogenase sowie die Cytosin-Desaminase und weitere Enzyme des Pyrimidinabbaues einer eingehenden Prüfung unterzogen. Über den eigentlichen enzymatischen Nachweis hinausgehend wurden dabei die Faktoren näher charakterisiert, welche die Biosynthese dieser Enzyme in wachsenden Bakterien beeinflussen. Neben den chemolithotrophen Stämmen von Hydrogenomonas wurden in die Untersuchungen zur Ureasebildung auch eine Reihe heterotropher Bakterienstämme mit einbezogen. Die Enzyme des Pyrimidinabbaues wurden an Wildtypzellen der chemolithotrophen Stämme untersucht und an Mutanten, die nicht mehr in der Lage waren, Uracil als Stickstoffquelle zu verwerten.

## B. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

### I. Einfluß von Stickstoffquellen auf die Verwertung von Harnstoff, Glutamat und Ammoniak

#### 1. Harnstoffverwertung

Die Unterscheidung zwischen urease-negativen und urease-positiven Stämmen ist wiederholt für die Klassifizierung von Bakterien herangezogen worden. Die Fähigkeit Urease zu bilden, ist vorwiegend auf dem Indikatornährboden nach CHRISTENSEN (1946) geprüft worden, wobei die Spaltung des Harnstoffs an der Freisetzung von Ammonium-Ionen und der dadurch verursachten pH-Änderung mit Hilfe eines pH-Indikatorfarbstoffs sichtbar gemacht wird. Darüber hinaus sind eine Anzahl auf dem gleichen Prinzip beruhender Testmethoden beschrieben worden (STUART et al. 1945, CLARK u. COWAN 1952, BORNSIDE u. KALLIO 1955). Eine Methode, bei der zur Erkennung der Ammonium-Ionen Nesslers Reagenz hinzugefügt wird, wurde von ELEK (1948) beschrieben.

Mit Hilfe dieser Verfahren ist es möglich, Stämme wie beispielsweise Proteus vulgaris und Sporosarcina ureae als eindeutig urease-positiv und andere wie beispielsweise Escherichia coli, Serratia marcescens und Salmonella sp. als eindeutig urease-negativ zu erkennen. Es fällt jedoch auf, daß bei einer dritten Gruppe von Organismen, zu der vor allem die Pseudomonaden gehören, die Anwendung dieser Reaktion zu keinen eindeutigen Ergebnissen geführt hat (SENECA et al. 1962, JEFFRIES 1964, STEWART 1965, NITSCH und KUTZNER 1968).

Enzymologische Untersuchungen haben jedoch ergeben, daß bei einigen Pseudomonaden, bei Lactobacillus bifidus, Micrococcus denitrificans und Hydrogenomonas (DeTURK 1955, GIBBONS u. DOETSCH 1959, KLECZKOWSKI et al. 1966, KÖNIG et al. 1966) in Gegenwart von Ammonium-Ionen nur geringe Mengen an Urease gebildet werden. Nach Wachstum mit Harnstoff oder unter N-Mangelbedingungen fand dagegen ein starker Anstieg der Ureasebildung

statt. Dieses Regulationsphänomen mag einmal auf eine Induktion der Ureasebildung durch Harnstoff zum anderen auf eine Repression durch Ammonium-Ionen zurückzuführen sein. Nach den Untersuchungen von De TURK (1955) wirken beide Regulationsprozesse wechselseitig gegeneinander, wobei primär das Enzym durch Harnstoff induziert wird.

Bei Hydrogenomonas H16 scheint dagegen die Ureasebildung allein durch die Ammonium-Ionen reguliert zu werden. In Gegenwart von Ammonium-Ionen wird die Enzymbildung reprimiert, unter N-Mangel findet eine Derepression der Ureasebildung statt (KÖNIG et al. 1966, KÖNIG und SCHLEGEL 1967). Diese Fragestellung wurde bei einer Anzahl von Bakterienstämmen untersucht und zusätzlich das Verhalten auf Urease-Testnährböden geprüft.

a) Repression der Ureasebildung durch komplexe N-Quellen und Ammoniak

Hydrogenomonas H16 wächst organotroph in einfachen Mineralmedien, welche neben Mineralstoffen als Stickstoffquelle Ammoniumchlorid und als Kohlenstoffquelle Fructose enthalten. Ist dabei Ammoniumchlorid in wachstumsbegrenzender Menge vorhanden, so kommt es während der stationären Wachstumsphase zur Ureasebildung. Liegt dagegen Ammoniumsalz im Überschuß vor, so wird die Ureasebildung reprimiert. Es war nun zu prüfen, ob die Ureasebildung bei anderen Bakterienarten einer vergleichbaren Regulation unterliegt. In die Untersuchung wurden auch Bakterienarten einbezogen, die nicht in Minimalmedium wachsen, sondern komplexe Nährlösungen benötigen. Es wurde deshalb auch bei H16 geprüft, ob komplexe Stickstoffquellen die Ureasebildung in dem gleichen Maße reprimieren wie Ammonium-Ionen, und ob nach deren Verbrauch ebenfalls eine durch Derepression bedingte Enzymsynthese einsetzt.

Hierzu wurden Zellen von H16 in einem fructosehaltigen Mineralmedium herangezogen, welches Trypton-Hefeextrakt bzw.Nutrient

Tab. 1: Ureaseaktivität von Zellextrakten aus Hydrogenomonas H16 nach Anzucht unter N-Mangel und N-Überschuß in Nutrient Broth-, Trypton-, Hefeextrakt- und Mineralmedium

| Fructose-Mineral-Medium | Ureaseaktivität in µmole $NH_4^+$/min/g Protein | | | |
|---|---|---|---|---|
| | N-Überschuß | | | N-Mangel |
| | Ohne zusätzliche N-Quelle | + 20 µmole $NH_4$-N/ml | + 20 µmole Harnstoff-N /ml | |
| + Try/HE | 1,7 | 1,4 | 0,8 | 386 |
| + NB | 1,6 | 4,3 | 1,7 | 312 |
| ohne Zusatz | kein Wachstum | 8,8 | 72,0 | 305* |

Die Anzucht erfolgte in jeweils 3 l Fructose-Mineralmedium, das für die N-Überschuß-Zellen durch Zusatz von 8 g Nutrient Broth (NB)/l, bzw. 5 g Trypton und 5 g Hefeextrakt und für die N-Mangel zellen durch Zusatz von 1,2 g NB, bzw. 0,63 g Trypton und 0,63 g Hefeextrakt je Liter ergänzt war. Die N-Mangelzellen wurden aus der stationären Wachstumsphase, die N-Überschußzellen aus der exponentiellen Wachstumsphase bei einer Trübung ( Extinktion bei 550 nm ) zwischen 1,0 und 1,7 geerntet.

*) mit 3µmolen $NH_4Cl$/ml

Broth (NB) als N-Quelle enthielt, und zwar sowohl im Überschuß als auch in wachstumsbegrenzender Menge. Der Verlauf des Wachstums wurde durch Trübungsmessung verfolgt. Die Zellen der stickstoffreichen Kultur wurden während der exponentiellen, die N-Mangelzellen ca. 10 Std. nach Eintritt in die stationäre Wachstumsphase geerntet. In Tab. 1 ist die in den Extrakten gemessene spezifische Ureaseaktivität angegeben. In den unter N-Mangel herangezogenen Zellen wurde in jedem Fall eine hohe Enzymaktivität gemessen, ganz gleich ob den Zellen zunächst Trypton-Hefeextrakt, NB oder Ammoniumchlorid als N-Quelle gedient hatte.

Mit komplexen N-Quellen im Überschuß blieben die Ureaseaktivitäten niedrig (1,7 U/g); zusätzlich verabreichtes Ammonium-

Tab. 2: Einfluß von Ammonium-Ionen und Harnstoff auf die Ureasebildung

| | Ureaseaktivität in µmolen $NH_4^+$/min/g Protein | |
|---|---|---|
| | NB + $NH_4^+$ | NB + $NH_4^+$ + Harnstoff |
| Hydrogenomonas H16 | 4,3 | 1,9 |
| Pseudomonas fluorescens 1590 | 0,4 | 0,2 |
| Micrococcus denitrificans | 0,2 | 1,5 |
| Sporosarcina ureae 858 | 460,0 | 420,0 |

Nährlösung wie in Tab. 3 mit Zusatz von 1 g $NH_4Cl$ bzw. 0,3 g Harnstoff je Liter. Die Zellen wurden aus der exponentiellen Wachstumsphase geerntet.

chlorid bewirkte keine weitere Repression. Im Gegenteil zeigte sich in diesen und anderen Experimenten, daß Ammonium-Ionen als alleinige N-Quelle die Ureasebildung nicht in dem Maße reprimieren wie die komplexen N-Quellen NB und Trypton-Hefeextrakt.

Wird Harnstoff als zusätzliche N-Quelle geboten, so bewirkt er weder bei H16 (Tab. 1) noch bei Pseudomonas fluorescens oder Micrococcus denitrificans (Tab. 2) eine zusätzliche Repression oder eine Induktion. Die gemessenen Enzymaktivitäten liegen unter 2 Einheiten Urease/ g Protein. Die in Micrococcus denitrificans unter Harnstoff + NB + Ammoniumchlorid gemessene siebenfach höhere Enzymaktivität kann als nicht signifikanter Unterschied angesehen werden, da bei einem anschließenden Experiment (Tab. 3) unter N-Überschuß nicht 0,2, sondern 2,9 E/g und bei N-Mangel eine um das 200fache über diesem Wert liegende Aktivität auftrat.

Auch bei dem untersuchten Stamm von Sporosarcina ureae, bei dem die Ureasebildung nicht reprimiert wird, hat zusätzlich gebotener Harnstoff keinen Einfluß auf die spezifische Ureaseaktivität. Bei H16 führt Harnstoff nur dann zu einer Erhöhung der

Ureaseaktivität, wenn er als einzige N-Quelle geboten wird. Jedoch bleibt die Enzymaktivität auch unter diesen Bedingungen wesentlich niedriger als unter N-Mangelbedingungen (Tab. 1).

Die in Tab. 1 und 2 zusammengefaßten Versuche hatten ergeben, daß Trypton-Hefeextrakt und Nutrient Broth eine mindestens ebenso vollständige Repression auslösen wie Ammoniumchlorid und daß nach Verbrauch dieser komplexen N-Quellen ebenfalls eine derepressive Ureasebildung einsetzt. Unter Verwendung dieser N-Quellen wurde nun eine Anzahl von Bakterienarten auf das Vorhandensein und die Repression von Urease hin unter Einhaltung einheitlicher Versuchsbedingungen untersucht.

b) Prüfung auf Ureasebildung unter N-Mangelbedingungen

Zum Vergleich der spezifischen Ureaseaktivität in N-Mangelzellen und in N-Überschußzellen wurde jeder Bakterienstamm in zwei parallelen Ansätzen herangezogen. Die Nährlösungen enthielten Fructose oder Glucose als C- und Energie- Quelle, unterschieden sich aber in der Konzentration der N-Quelle. Die in der stickstoffreichen Nährlösung gewachsenen Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase, die in der stickstoffarmen Nährlösung gewachsenen Zellen etwa 12 Stunden nach Eintritt in die stationäre Wachstumsphase geerntet.

Auf Grund der in Tab. 3 zusammengestellten Ergebnisse der Ureasebestimmungen lassen sich die untersuchten Bakterienstämme in 3 Gruppen einteilen: Die Stämme der ersten Gruppe, Sporosarcina ureae und Proteus vulgaris, enthielten 400 bzw. 2500 Einheiten Urease/ g Protein, und zwar nicht nur unter N-Mangelbedingungen, sondern auch nach Anzucht im N-reichen Medium. Bei diesen Stämmen liegt Urease offenbar als konstitutives Enzym vor.

In eine zweite Gruppe lassen sich Escherichia coli B, Bacillus polymyxa und Serratia marcescens zusammenfassen. In Extrakten aus diesen Zellen wurden nach Anzucht weder in N-reichen noch

Tab. 3: Ureaseaktivität verschiedener Bakterienstämme nach Anzucht unter Stickstoffüberschuß und Stickstoffmangel

| Gruppe | Organismus | Stamm | N-Überschuß-Zellen (log-Phase) | | N-Mangel-Zellen (stat.Phase) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $E_{550}$ bei Ernte | Urease-aktivität | $E_{550}$ bei Ernte | Urease-aktivität |
| 1 | S. ureae | 858 | 1,05 | 420 | 0,96 | 390 |
| | P. vulgaris | 1533 | 1,00 | 2783 | 0,53 | 2487 |
| 2 | E. coli B | 1701 | 1,52 | 0 | 2,01 | 0 |
| | B. polymyxa | 1501 | 1,36 | 0 | 1,23 | 0 |
| | S. marcescens | 1534 | 1,51 | 0 | 0,89 | 0 |
| 3 | Hydrogenomonas* | H16 | 1,66 | 1,6 | 1,86 | 312 |
| | P. aeruginosa | 1536 | 1,54 | 2,1 | 2,19 | 512 |
| | B. megaterium | 1521 | 1,19 | 7,7 | 0,80 | 134 |
| | P. fluorescens** | 1590 | 2,06 | 1 | 0,84 | 125 |
| | P. fluorescens | 1591 | 2,26 | 1 | 1,12 | 31 |
| | M. denitrificans | 1628 | 2,60 | 2,9 | 3,34 | 713 |
| | M. cerificans | 1626 | 1,90 | 39 | 0,70 | 736 |

*) Fructose als C-Quelle

**) Als C-Quelle: 2 g Glucose, 2 g Na-succinat, 2 g Na-malat

In 6 l Rührkolben wurden je 1 l Nährlösung mit 10 ml einer Vo - kultur beimpft. Das N-Überschußmedium enthielt in 1 l Mineralmedium 8 g NB und 1 g Glucose. Geerntet wurden die Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase. Das N-Mangelmedium enthielt 1,2 g NB und 5 g Glucose in 1 l Mineralmedium. Die Zellen wurden ca. 10 - 15 Stunden nach Eintritt in die stationäre Phase geerntet. Spezifische Ureaseaktivität ist angegeben in umolen $NH_4^+$/min/g Protein.

in N-armen Nährlösungen meßbare Ureaseaktivitäten gefunden. Die Stämme sind daher als urease-negativ anzusehen.

Die dritte Gruppe umfaßt Bakterien, die Urease lediglich in Abwesenheit einer äußeren N-Quelle produzieren. Mit einem Überschuß an den komplexen N-Quellen gewachsene Zellen verfügen über nur geringe Ureaseaktivitäten. Die Urease wird erst nach Verbrauch der N-Quelle gebildet und erreicht dann die 20 bis 250-fache spezifische Aktivität der N-Überschußzellen.

Abb. 1 macht die charakteristischen Unterschiede im Verhalten von Proteus vulgaris (Gruppe 1) und Pseudomonas aeruginosa (Gruppe 3) während der Inkubation in einem N-freien Vollmedium deutlich. Bei Pseudomonas aeruginosa nimmt die spezifische Ureaseaktivität innerhalb von 10 Stunden von 20 auf mehr als 400 E/ g Protein zu. Demgegenüber verfügt Proteus vulgaris bereits nach Wachstum in einer N-reichen Nährlösung über eine spezifische Ureaseaktivität von 3000 E/ g Protein. Sie steigt im Laufe der Versuchszeit um nur 6 % an.

c) Ureasenachweis auf herkömmlichen und modifizierten Indikatornährböden

Weitere Versuchsreihen zielten auf die Klärung der Frage ab, ob die Verfahren zum Ureasenachweis auf herkömmlichen und modifizierten Indikatornährböden zu Aussagen gelangen lassen, die mit den nach den aufwendigeren Wachstumsversuchen und enzymatischen Bestimmungen erhobenen Befunden übereinstimmen. Die bereits geprüften und einige weitere Bakterienstämme wurden in dünner Suspension auf drei verschiedene Nährböden geimpft, deren Zusammensetzung dem von CHRISTENSEN (1946) empfohlenen Indikatornährboden entsprach (Tab. 4). Alle Nährböden enthielten Mineralien, Harnstoff, Glucose, Fructose und Phenolrot. Dem Nährboden A war Ammoniumchlorid zur Repression der Ureasebildung bei den repressiblen Stämmen zugesetzt worden. Nährboden B war ammoniakfrei und Nährboden C entsprach dem CHRISTENSEN-Medium, das zusätzlich Bactopepton enthält. Auf Nährboden B, der Harnstoff als einzige N-

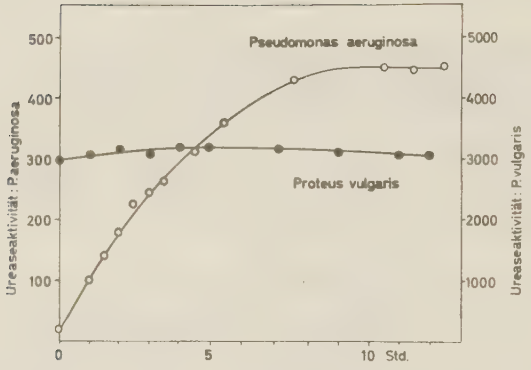



Abb. 1. Veränderung der Ureaseaktivität während der Inkubation gewaschener und resuspendierter Zellen von Pseudomonas aeruginosa und Proteus vulgaris unter Stickstoffmangel

Die Anzucht von Pseudomonas aeruginosa und Proteus vulgaris erfolgte in 3 l Mineralmedium unter Zusatz von 1 g $NH_4Cl$/ Liter, 5 g Glucose/ Liter und für P. vulgaris 0,3 g NB/ Liter und 0,1 mg Nicotinsäure/ Liter. Die Zellen wurden bei $E_{550}$ = 1,5 aus der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, zweimal mit 0,066 M Phosphatpuffer gewaschen und in 3 l N-freiem Mineral-Glucose-Medium ohne $NH_4Cl$ - für Proteus unter Zusatz von 0,1 mg Nicotinsäure/ Liter - resuspendiert. Die Inkubation erfolgte unter Belüftung und magnetischem Rühren bei 28°C. Zur Messung der Ureaseaktivität wurden je Probe 150 ml der Zellsuspension abzentrifugiert, gewaschen und in 3 ml 0,066 M Phosphatpuffer aufgenommen. Spezifische Ureaseaktivität ist angegeben in umolen $NH_4$+/ min/g Protein.

Quelle enthielt, sollte die Repression vermieden werden. Auf A sollte geprüft werden, ob sich die durch Ammonium-Ionen bewirkte Repression auch im Plattentest nachweisen läßt.

In Tab. 4 sind die Ergebnisse dieser vergleichenden Prüfung zusammengestellt. Bei den Angehörigen der Gruppen 1 und 2 lassen sich eindeutige Aussagen machen. Bei den urease-positiven Stämmen der Gruppe 1 wird die Ureasebildung bereits nach ein oder zwei Tagen an der Rotfärbung des Agars sichtbar. Diese Stämme führen auch auf Nährboden A zu einer Rotfärbung. Durch Ammoniumchlorid wird bei diesen Stämmen die Ureasebildung nicht reprimiert. Die Harnstoffspaltung auf beiden Indikatornährböden zeigt somit den konstitutiven Charakter der Enzymsynthese an, der durch Untersuchungen an zellfreien Extrakten (Tab. 3) bereits nachgewiesen worden war.

Anders liegen die Verhältnisse bei den urease-positiven Organismen ( Gruppe 3 ), bei denen die Enzymbildung der Repression unterliegt. Geprüft nach der CHRISTENSEN-Methode erwiesen sich einige der untersuchten Stämme als urease-positiv, andere selbst nach 7 Tagen als scheinbar urease-negativ. Demgegenüber waren auf dem Indikatornährboden B mit Harnstoff als alleiniger N-Quelle alle untersuchten Organismen dieser Gruppe nach längeren Wachstumsperioden (2 - 9 Tage) als urease-positiv zu erkennen.

Die Repression der Enzymbildung ließ sich bei den von uns untersuchten Stämmen mit Hilfe des einfachen Plattentests erkennen. Im Gegensatz zum Testmedium B blieb bei 11 von 13 untersuchten Stämmen die Alkalinisierung auf dem Nährboden A während der Dauer des Versuchs aus. Bei den letzten beiden Stämmen (Micrococcus cerificans und Bacillus megaterium) wurde eine schwache Rotfärbung erst wesentlich später als auf den Kontrollplatten ohne Ammonium-Ionen sichtbar, so daß auch in diesen Fällen die Repression der Enzymbildung deutlich erkennbar war.

Tab. 4: Prüfung verschiedener Bakterienstämme bezüglich Ureasebildung auf festen Indikatornährböden

| Gruppe | Organismus | Indikator(Phenolrot)-Nährböden | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | A | | B | | C | |
| | | Rotfärbung | Zeit in Tagen | Rotfärbung | Zeit in Tagen | Rotfärbung | Zeit in Tagen |
| 1 | S. ureae 858 | + | 2 | + | 2 | + | 1 |
| | S. ureae 860 | + | 2 | + | 2 | + | 1 |
| | P. vulgaris | + | 1 | + | 1 | + | 1 |
| | B. pasteurii | + | 1 | + | 1 | + | 1 |
| | A. vinelandii | + | 2 | + | 2 | + | 2 |
| 2 | E. coli B | - | 7 | - | 7 | - | 7 |
| | B. polymyxa | - | 7 | - | 7 | - | 7 |
| | Serratia marcescens | - | 7 | - | 7 | - | 7 |
| 3a | Hydrogenomonas eutropha, H16, H1, H2, H20 | - | 7 | + | 3 | + | 6 |
| | Hydrogenomonas 11 x | - | 10 | + | 7 | + | 9 |
| | Hydrogenomonas 12 x | - | 7 | + | 6 | + | 7 |
| | P. aeruginosa | - | 7 | + | 5 | + | 5 |
| 3b | Vibrio 01 | - | 7 | + | 6 | - | 7 |
| | P. fluorescens 1590 | - | 7 | + | 7 | - | 7 |
| | P. fluorescens 1591 | - | 10 | + | 9 | - | 10 |
| | M. denitrificans | - | 7 | + | 2 | - | 7 |
| 3c | M. cerificans | ± | 6 | + | 2 | - | 7 |
| | B. megaterium | + | 4 | + | 2 | + | 2 |

Tab. 4: Die Indikatornährböden wurden in Petrischalen ausgegossen, beimpft (A und B sehr dünn), bei 28°C inkubiert und täglich auf Rotfärbung des Agarnährbodens kontrolliert. Die Indikatornährböden hatten folgende Zusammensetzung: A. 1 g $NH_4Cl$, 20 g Harnstoff, 2 g $KH_2PO_4$, 2,5 g Glucose, 2,5 g Fructose, 0,2 $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 5 mg Eisenammoncitrat, 2,5 mg $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$, 5 ml Phenolrot 0,2%ig, 20 g Agar, Aqua dest. ad 1000 ml, pH 6,8 - 9. Testmedium B wie A, jedoch ohne $NH_4Cl$. Testmedium C entspricht dem Christensen-Medium (CHRISTENSEN 1946), jedoch wurde statt 1 g Glucose 0,5 g Glucose und 0,5 g Fructose verwendet: 1 g Bactopepton, 5 g NaCl, 2 g $KH_2PO_4$, 0,5 g Glucose, 0,5 g Fructose, 20 g Harnstoff, 6 ml Phenolrotlösung 0,2%ig, 20 g Agar, Aqua dest. ad 1000 ml, pH 6,8 - 6,9.

d) Isolierung und Charakterisierung von transportgeschädigten Hydrogenomonas H16-Mutanten

Urease wurde bisher nur als endogenes Enzym gefunden: Zur Harnstoffhydrolyse muß der Harnstoff durch die Zellwand transportiert werden. In Proteus rettgeri verläuft dieser Transport des Harnstoffs langsamer als die sich anschließende enzymatische Spaltung in Ammoniak und Kohlendioxyd (MAGANA-PLAZA und RUIZ-HERRERA 1967). Im Folgenden wird über die Isolierung von Mutanten von H16 berichtet, die nicht mehr mit Harnstoff wuchsen aber noch Urease bilden konnten.

Unter N-Mangel setzt bei H16 eine starke Ureasebildung ein. Die angegebene Methode zur Isolierung von H16-Mutanten (REH 1967) mußte deshalb insoweit abgeändert werden, als zum Abbau der zelleigenen Aminosäurereserven die Zellen nur kurz (maximal eine Stunde) in einem N-freien Medium inkubiert wurden. Die Grundaktivität der Urease ist in einem Ammoniumchlorid- oder in einem Harnstoffmedium relativ hoch (10 bzw. 70 E/g), so daß während der Anreicherung der Mutanten mit Harnstoff und Colistin mit einem hohen Syntrophieeffekt zu rechnen war. Um die Ammoniakkonzentration im Medium nicht zu groß werden zu lassen, wurde die Anreicherung der Mutanten nach 8Stunden unterbrochen. Die Zellen wurden gewaschen und mit neuer Harnstoff-Colistin-Lösung inkubiert.

Tab. 5: Substratverwertung durch H16 und durch transportgeschädigte Mutanten

| N-Quelle | Organismus | | |
|---|---|---|---|
| | H16 | H16-Mutanten Gruppe 1 | Gruppe 2 |
| $NH_4Cl$ | ++ | + | + |
| Harnstoff | ++ | - | - |
| Cytosin | + | - | - |
| 3-UP | + | - | - |
| Glutamat | ++ | ++ | ++ |
| Aspartat | ++ | ++ | ++ |
| ß-Alanin | ++ | - | - |

Mit 0,1 ml Suspension einer Schrägröhrchenkultur wurden 10 ml Fructose-Mineralösung beimpft. Die Ansätze enthielten 10 µmole der betreffenden N-Quelle je ml. Das Wachstum der Kulturen wurde nach 6 Tagen gegen eine Kontrolle ohne N-Quelle abgeschätzt. Gruppe 1 umfaßt die fünf in dieser Arbeit beschriebenen transportgeschädigten Mutanten. In Gruppe 2 sind drei Mutantenstämme zusammengefaßt, die von Herrn Dr. Kaltwasser nach der oben beschriebenen Methode isoliert wurden.

Zeichenerklärung:

- = kein erhöhtes Wachstum gegenüber der Kontrolle ohne N-Quelle

(+) = schwache Förderung des Wachstums gegenüber der Kontrolle

\+ = gutes Wachstum

++ = sehr gutes Wachstum

Aus 5 unabhängigen Anreicherungsansätzen wurden 5 Mutanten isoliert, die noch autotroph und heterotroph mit Ammoniumchlorid als N-Quelle aber nicht mit Harnstoff wuchsen. Alle Stämme hatten nach Wachstum mit Ammoniumchlorid eine Ureaseaktivität von ca. 10 E/g. Unter N-Mangel wurde in allen untersuchten Mutanten die Urease wie im Wildstamm synthetisiert. Die spezifischen Aktivitäten stiegen dabei bis auf 260 E/g an. Glutamat-Dehydrogenase und Glutamin-Synthetase ließen sich in den Mutanten ebenfalls nachweisen.

Im Hinblick auf eine unspezifische Harnstoffpermease wurde die Fähigkeit der Mutanten untersucht, eine Reihe anderer N-haltiger Substanzen als N-Quellen zu verwerten. Der Wildstamm H16 und die Mutanten wurden auf NB-Schrägröhrchen vorgezogen und in 0,9%iger NaCl-Lösung suspendiert. Mit dieser Suspension wurden je 10 ml Nährlösung, die Fructose und die betreffende N-Quelle enthielten, beimpft. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 5 zusammengestellt. H16 konnte alle angebotenen Substrate gut als N-Quelle nutzen. Bemerkenswerterweise verwertete H16 auch 3-Ureidopropionat, ein Intermediärprodukt des reduktiven Cytosinabbaues, obwohl H16 Cytosin nur bis zum Uracil abbauen kann (KALTWASSER und KRÄMER 1968). Die Mutanten verwerteten Ammoniumchlorid, Glutamat und Aspartat gut als N-Quelle. Dagegen konnte mit ß-Alanin, Cytosin, 3-Ureidopropionat oder Harnstoff als N-Quelle kein Wachstum beobachtet werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die H16-Mutanten, die nicht mehr mit Harnstoff als N-Quelle zu wachsen vermögen, trotzdem noch Urease synthetisieren. Offenbar beruht der Defekt der Mutanten auf dem Unvermögen, Harnstoff in das Zellinnere zu transportieren. Die Permease für Harnstoff scheint bei H16 auch für den Transport anderer N-haltiger Verbindungen verantwortlich zu sein: Ist die Bildung der Harnstoffpermease durch eine Mutation blockiert, so wird auch 3-Ureidopropionat, Cytosin und ß-Alanin nicht als N-Quelle genutzt.

## 2. Bildung und Verwertung von Glutamat durch Hydrogenomonas H16

### a) Nachweis einer NAD- und einer NADP-spezifischen Glutamat-Dehydrogenase

In tierischen Geweben, in höheren Pflanzen und in der überwiegenden Zahl von Pilzen und Bakterien ist nur ein einziges Enzym für den Abbau des Glutamats zu Ammoniak und α-Ketoglutarsäure und für die Synthese der Aminosäure aus diesen Spaltprodukten verantwortlich. Die Glutamat-Dehydrogenase (L-Glutamat-NAD(P)-Oxydoreductase, E. C. 1. 4. 1. 3.), die diese Reaktionen katalysiert, reagiert entweder mit NAD und mit NADP als Coenzym oder nur mit NAD oder nur mit NADP.

Zwei Glutamat-Dehydrogenasen, von denen die eine spezifisch für NAD und die andere spezifisch für NADP ist, wurden bisher bei Hefe (HOLZER und SCHNEIDER 1957), bei Neurospora crassa (SANWAL und LATA 1961), bei Fusarium (SANWAL 1961), bei Piricularia oryzae (KATO et al. 1962) und bei Schizophyllum (DENNEN und NIEDERPRUEM 1967) gefunden. Die Untersuchungen an Hydrogenomonas H16 zeigen, daß es auch in Bakterien zwei Glutamat-Dehydrogenasen mit verschiedenen Funktionen im Stoffwechsel geben kann. Vor kurzem sind bei Thiobacillus novellus, einem anderen chemolithotrophen Bakterium, ebenfalls eine NAD- und eine NADP-abhängige Glutamat-Dehydrogenase nachgewiesen worden (LE JOHN und McCREA 1968 a und b).

#### pH-Optimum der Glutamat-Dehydrogenase

Zellfreie Extrakte von Hydrogenomonas H16 katalysieren die Synthese der Glutaminsäure aus Ammoniak und α-Ketoglutarsäure. Die Reaktion läuft dabei sowohl mit $NADH_2$ als auch mit $NADPH_2$ als Coenzym ab. Unter den angegebenen Meßbedingungen lag das Maximum der $NADH_2$-Oxidation bei pH 7,7, während es für die $NADPH_2$-Oxidation bei pH 8,3 lag. Bei dem Vergleich der spezifischen Aktivitäten in verschiedenen Puffersystemen (0,05 M $KH_2PO_4$; 0,05 M Tris; 0,1 M Citrat) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

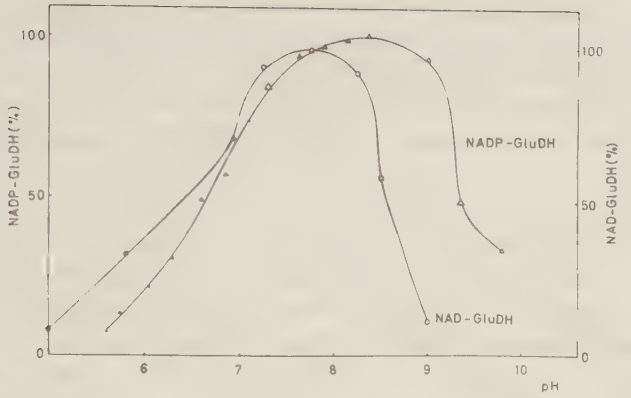



Abb. 2: pH-Optimum der NAD- und der NADP-spezifischen Glutamat-Dehydrogenase

Die Reaktionsgemische (3 ml) enthielten 0,8 µmole $NADPH_2$ bzw. $NADH_2$, 3 µmole EDTA, 25 µmole α-KGS, 0,02 ml (= 0,75 mg Protein) zellfreier Extrakt aus N-Mangelzellen, 200 µmole $NH_4Cl$ und Puffer ad 3 ml. Die spezifische Aktivität der GluDH ist als Prozentsatz des höchsten gemessenen Wertes (100 %) angegeben.

Test in 0,05 M $KH_2PO_4$-Puffer ▲●——●▲

Test in 0,05 M Tris-Puffer △○——○△

Hitzeinaktivierung

Um zu prüfen, ob an den Umsetzungen mit NAD und NADP zwei Enzyme beteiligt sind, wurde der Einfluß verschiedener Temperaturen auf die Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase untersucht. Ein aliquoter Teil eines zellfreien Extraktes von H16 wurde jeweils 3 Minuten lang auf die angegebene Temperatur in einem Wasserbad erhitzt und rasch auf +4°C abgekühlt. Anschließend wurde die Reaktionsgeschwindigkeit für die NAD- und die NADP-abhängige Reaktion bestimmt. Der Abfall der Enzymaktivität erfolgte in einem sehr engen Bereich zwischen 40 und 65°C für beide Reaktionen. Nach der Inkubation bei 59°C war die spezifische Aktivität der NADP-spezifischen Glutamat-Dehydrogenase im Vergleich zu den in

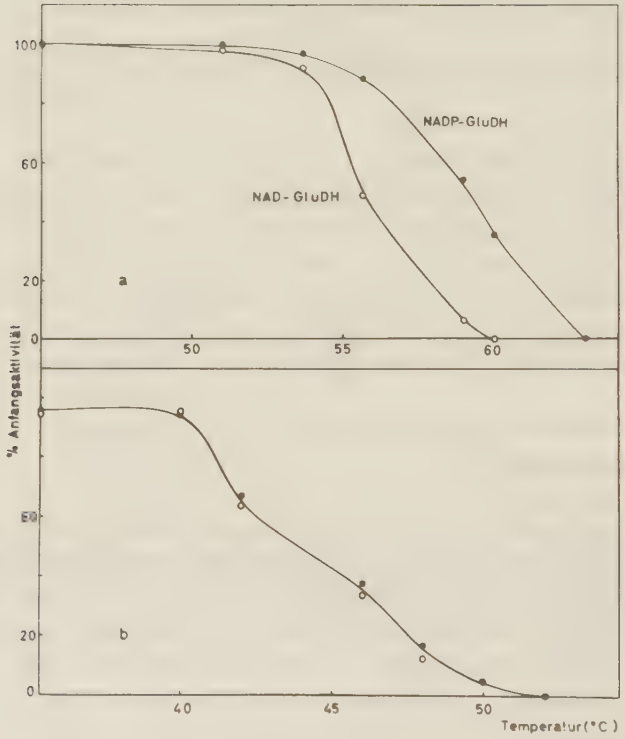



Abb. 3: Hitzeinaktivierung der Glutamat-Dehydrogenase im zellfreien Extrakt von Hydrogenomonas H16 und von reiner Rinderleber-Glutamat-Dehydrogenase

a. In einem aus N-Mangelzellen hergestellten zellfreien Extrakt von Hydrogenomonas H16 wurde die spezifische Aktivität der NAD- und der NADP-GluDH bestimmt (Anfangsaktivität). Nach der Erhitzung (3 Minuten lang) von je 0,4 ml des Rohextraktes in einem Wasserbad auf die angegebene Temperatur, wurde der zellfreie Extrakt in einem Eisbad abgekühlt und zur Messung der GluDH verwendet. Der Grad der Inaktivierung des Enzyms ist angegeben als prozentualer Anteil der verbliebenen spezifischen GluDH-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (unbehandelte Kontrolle = 100 %).
b. Es wurde eine Suspension von reiner Rinderleber-GluDH in Glycerin verwendet. Versuchsbedingungen wie in Abb. 3a.
GluDH (NAD): O——O GluDH (NADP): ●——●

der unbehandelten Probe gemessenen Werten um die Hälfte gesunken, während die NAD-GluDH schon zu 93 % inaktiviert war. Nach einer 3 Minuten langen Erhitzung auf 60°C zeigte die NAD-GluDH keine Aktivität mehr. Von der NADP-GluDH war unter diesen Bedingungen noch 36 % der Enzymaktivität übrig geblieben. 65°C inaktivierten die Glutamat-Dehydrogenase völlig.

In Abb. 3b ist das Verhalten von gereinigter Rinderleber-Glutamat-Dehydrogenase unter den gleichen Versuchsbedingungen wiedergegeben. Die Rinderleber-Glutamat-Dehydrogenase besteht aus einem Enzym, das sowohl mit NAD als auch mit NADP reagieren kann. Die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms erfolgte in einem Temperaturbereich zwischen 35° und 55°C. Die Inaktivierung der NAD- und der NADP-abhängigen Reaktion war innerhalb der Meßgenauigkeit bei allen angegebenen Temperaturen immer gleich groß.

Verhältnisse der spezifischen Aktivitäten der NAD- zur NADP-Glutamat-Dehydrogenase

Weitere Hinweise auf die Existenz von zwei Glutamat-Dehydrogenasen in H16 gaben die im folgenden Kapitel näher beschriebenen Versuche über den Einfluß von Stickstoffquellen auf die Bildung der Glutamat-Dehydrogenase. In Tab. 6 sind die spezifischen Aktivitäten der Glutamat-Dehydrogenase nach Anzucht mit verschiedenen Substraten zusammengestellt. Daraus ist ersichtlich, daß die Bildung der Glutamat-Dehydrogenase von der jeweiligen Zusammensetzung des Nährmediums beeinflußt wird. Würde es sich bei der Glutamat-Dehydrogenase nur um ein Enzym handeln, so müßte unter den verschiedenen Kulturbedingungen das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der NAD- zur NADP-abhängigen Glutamat-Dehydrogenase immer gleich hoch bleiben. Tatsächlich aber ändert sich dieser Wert. In einem Fructose-Ammoniumchloridmedium betrug das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der NADP- zur NAD-GluDH 6 : 1, nach Inkubation unter N-Mangel dagegen 0,9 : 1.

Hochtourige Zentrifugation

Bei hochtouriger Zentrifugation eines zellfreien Extraktes aus $NH_4Cl$-Zellen sedimentierte die NAD-GluDH schneller als die NADP-GluDH. Das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der NADP- zur NAD-GluDH stieg dabei von 2,8 : 1 im Rohextrakt (10 min/10 000 g) auf 3,2 : 1 nach 3stündiger Zentrifugation des Extraktes bei 100.000 g und auf 5,2 : 1 nach zweimaliger Zentrifugation des zellfreien Extraktes bei 100.000 g (je drei Stunden lang). Die NADP-GluDH wurde während der hochtourigen Zentrifugation auf das 3fache, die NAD-GluDH nur auf das 1,6fache angereichert.

Die Glutamat-Dehydrogenase bei Hydrogenomonas H16 besteht also aus zwei Enzymen mit verschiedener Coenzymspezifität, mit unterschiedlicher Regulation ihrer Biosynthesen und mit verschiedenen chemischen (Bindungen) und physikalischen (Sedimentierbarkeit) Eigenschaften.

b) Einfluß von Glutamat, Ammoniumchlorid und N-Mangel auf die Bildung der Urease, der Glutamat-Dehydrogenase und der Glutamin-Synthetase

In Hefe, in der eine NAD- und eine NADP-spezifische Glutamat-Dehydrogenase nachgewiesen wurde, wird die NAD-GluDH parallel (koordiniert) zur Glutamin-Synthetase reguliert (KOHLHAW et al. 1965). Die Synthese der beiden Enzyme setzt nach Übertragung der Zellen aus einem ammoniakhaltigen Medium in eine Nährlösung mit Glutamat als einziger N-Quelle ein. Die NADP-GluDH unterliegt in diesem Organismus keiner Beeinflussung durch äußere N-Quellen. In Neurospora crassa (SANWAL und LATA 1962) wurde dagegen unter den Kulturbedingungen, die einen Anstieg der NAD-GluDH bewirkten, immer gleichzeitig ein Abfall der NADP-GluDH-Aktivität beobachtet. Die Untersuchungen an chemolithotrophen und heterotrophen Bakterienstämmen hatten gezeigt, daß auch die Bildung der Urease durch N-Quellen des Mediums reprimiert und beim Fehlen einer N-Quelle dereprimiert wird. Es war

Tab. 6: Spezifische Aktivitäten der Glutamat-Dehydrogenase, der Urease und der Glutamin-Synthetase von Hydrogenomonas H16 nach Wachstum mit verschiedenen Substraten

| | C-Quelle : | Fruc | Fruc | Fruc+Glu | Glu | Fruc+Glu |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | N-Quelle : | $NH_4Cl$ | N-Mangel | Glu | Glu | $NH_4Cl$+Glu |
| Spezifische Enzymaktivitäten | Urease | 11,6 | 353 | 36 | 23 | 8 |
| | NAD-GluDH | 14 | 42 | 15 | 16 | 12 |
| | NADP-GluDH | 87 | 38 | 37 | 39 | 95 |
| | $GluNH_2$-S. | 2,2 | 7,2 | 2,7 | 3,2 | 2,5 |
| Verhältnis der spez. Enzym-aktivitäten | $\frac{\text{NADP-GluDH}}{\text{NAD-GluDH}}$ | 6,2 | 0,9 | 2,4 | 2,4 | 7,7 |
| | $\frac{\text{NADP-GluDH}}{GluNH_2\text{-S.}}$ | 6,3 | 5,8 | 5,5 | 4,8 | 4,8 |

Zellen von Hydrogenomonas H16 wurden mit Fructose (5mg/ml) oder Glutamat (20 µmole/ml) als C-Quelle und mit $NH_4Cl$ (20 µmole/ml) oder Glutamat (10 µmole/ml) als N-Quelle herangezogen und bei einer Extinktion von 1,2 bis 1,6 (E = 550 nm) geerntet. Die unter N-Mangelbedingungen mit $NH_4Cl$ als N-Quelle gewachsenen Zellen wurden bei einer Extinktion von 4,3 12 Stunden nach Erreichen der stationären Phase geerntet. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme sind angegeben in verbrauchtes bzw. gebildetes $NH_3$/min/g Protein (GluDH bzw. Urease) und in $E_{550}$/min/g Protein (Glutamin-Synthetase).

Abkürzungen: Fruc (Fructose); Glu (Glutamat); $GluNH_2$-S. (Glutamin-Synthetase)

deshalb von Interesse zu erfahren, ob auch die Glutamat-Dehydrogenase und die Glutamin-Synthetase bei Hydrogenomonas H16 einer vergleichbaren Regulation wie die Urease unterliegen.

Enzymaktivitäten nach Anzucht unter verschiedenen Kulturbedingungen

Hydrogenomonas H16 wurde in je 1 Liter Nährlösung mit verschiedenen Substraten angezogen und aus der exponentiellen Phase geerntet. Die Ernte der N-Mangelzellen erfolgte nach Anzucht mit einer begrenzenden Menge an Ammoniumchlorid (3 µmole/ml) etwa 10 Stunden nach Eintritt in die stationäre Wachstumsphase. Die spezifischen Aktivitäten der NAD-GluDH, der NADP-GluDH, der Glutamin-Synthetase und der Urease, die in diesen Zellen gemessen wurde, sind in Tab. 6 zusammengestellt.

Urease: In Extrakten aus N-Mangelzellen wurde eine 26fach höhere spezifische Aktivität der Urease gemessen als in Extrakten aus N-Überschußzellen. Die 2- bis 3fach höheren Aktivitäten nach Wachstum mit Glutaminsäure als einziger C- und N-Quelle (23 E/g) und mit Glutaminsäure als N-Quelle (36 E/g) beruhen offenbar auf einer ähnlichen Derepression der Enzymbildung wie sie nach Anzucht mit Harnstoff als alleiniger N-Quelle beobachtet wurde (Tab. 1). Mit Glutaminsäure und Ammoniumchlorid als Substraten entsprach die Ureaseaktivität (8 E/g) dann auch wieder dem in einem Ammoniumchlorid-Medium gemessenen Wert (11 E/g).

NAD-Glutamat-Dehydrogenase: Etwa gleich niedrige NAD-GluDH-Aktivitäten fanden sich in Zellen, die mit Ammoniumchlorid oder Glutaminsäure als N-Quelle oder mit Glutaminsäure als C- und N-Quelle angezogen worden waren (12 bis 16 E/g). Es war weder eine Induktionswirkung des Glutamats noch eine Derepression der Enzymbildung nach Wachstum mit Glutaminsäure feststellbar. Die spezifische Aktivität der NAD-GluDH war 10 Stunden nach Verbrauch der äußeren N-Quelle auf 42 E/g angestiegen.

**NADP-Glutamat-Dehydrogenase:** Die höchsten Enzymaktivitäten der NADP-GluDH hatten die Zellen, die in Gegenwart von Ammoniumchlorid gewachsen waren. Die spezifische Aktivität war nach Anzucht mit Fructose/ Ammoniumchlorid (87 E/g) oder mit Fructose/ Ammoniumchlorid/ Glutamat (95 E/g) etwa dreimal so hoch wie nach Wachstum mit Fructose/Glutamat (37 E/g) oder mit einer begrenzenden Menge an Ammoniumchlorid (38 E/g). Mittlere Enzymaktivitäten wurden in Zellen gemessen, denen Glutamat als C- und N-Quelle diente (48 E/g). Aber auch in diesem Medium wird durch die Spaltung der Glutaminsäure zur Deckung des C- und Energiebedarfes der Zelle Ammoniak im Überschuß produziert.

Glutamin-Synthetase: Die spezifische Aktivität der Glutamin-Synthetase war in Zellen, die unter N-Mangelbedingungen herangezogen worden waren, ca. 2,5 mal so hoch wie nach Anzucht in einem N-reichen Medium. Signifikante Unterschiede des Enzymniveaus in Glutamat-, in Glutamat/ Fructose- oder in Ammoniumchlorid/ Fructose-Zellen wurden nicht beobachtet.

Auf den Zusammenhang der verschiedenen Regulationsprozesse weisen die in Tab. 6 aufgeführten Verhältnisse der spezifischen Aktivitäten hin. Wie oben schon erwähnt wurde, ist das Verhältnis der NADP- zur NAD-GluDH-Aktivität von der jeweiligen Zusammensetzung des Kulturmediums abhängig. Unter N-Mangel hatte die NAD-GluDH ihre höchste Aktivität, während für die NADP-GluDH in ammoniumchloridhaltigen Medien die höchsten Werte gefunden wurden. Diese Befunde deuten darauf hin, daß die NADP-GluDH den Einbau des Ammoniaks katalysiert, während die durch N-Quellen reprimierbare NAD-GluDH für den Abbau des Glutamats verantwortlich ist. Das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der NAD-GluDH zur Glutamin-Synthetase läßt erkennen, daß die Regulation beider Enzyme eng zusammenhängt. Das Verhältnis bleibt unter allen angegebenen Kulturbedingungen nahezu konstant (4,8 bis 6,3). Das heißt, daß die beiden Enzyme parallel (koordiniert) reprimiert und dereprimiert werden. Im Gegensatz dazu unterliegt das Verhältnis der NAD-GluDH zur gleichfalls

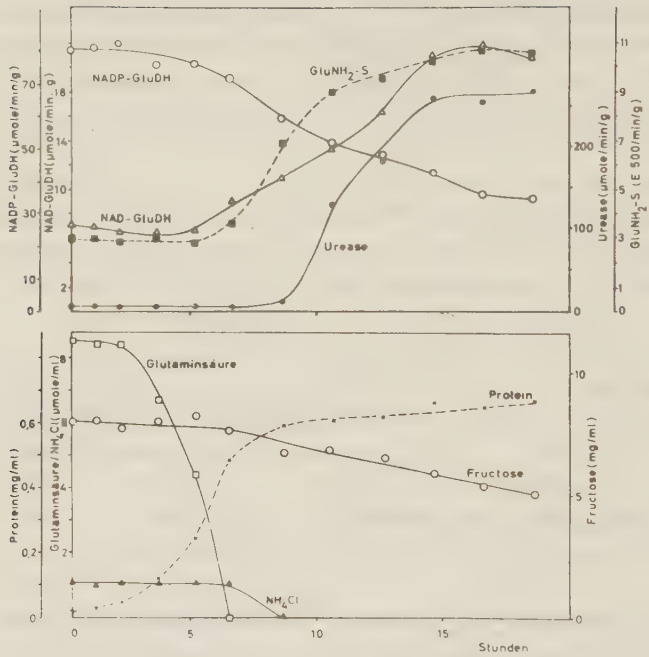



Abb. 4: Derepression der Urease, der NAD-Glutamat-Dehydrogenase und der Glutamin-Synthetase

Hydrogenomonas H16 wurde in 1 Liter FM mit $NH_4Cl$ als N-Quelle herangezogen. Mit der exponentiell wachsenden Vorkultur (E = 1,0) wurden 13 l NL in einem 15 l Fermenter beimpft. Nach dem Beimpfen setzte sich die NL folgendermaßen zusammen: Mineralien, 1 % Fructose, 1 µmol $NH_3$/ml und 10 µmole Glutamat je ml. Die Kultur wurde bei 30°C unter starker Belüftung und Rühren inkubiert. Je 100 bis 300 ml Probe wurden zu den angegebenen Zeiten steril entnommen und Aliquots bis zur Bestimmung des Protein-, Glutamat-, $NH_3$- und Enzym-Gehaltes bei -15°C eingefroren.

unter N-Mangel derepressiv gebildeten Urease großen Schwankungen (0,9 bis 7,7).

Veränderung der spezifischen Enzymaktivitäten unter N-Mangel

Um diese komplexen, teilweise zusammenhängenden Regulationsvorgänge deutlicher zu machen, wurde Hydrogenomonas H16 unter N-Mangelbedingungen gebracht und der zeitliche Verlauf der Aktivitätsveränderungen der Enzyme verfolgt (Abb. 4). Hydrogenomonas H16 wurde in einem Medium mit einer begrenzenden Menge an Ammoniumchlorid und Glutamat und mit einem starken Überschuß an Fructose herangezogen. Proportional zum Anstieg des Proteingehaltes der Bakterienkultur nahm die Konzentration des Glutamats ab. Nach 6,5 Stunden war die Aminosäure aufgebraucht. Erst nach Verbrauch des Glutamats wurde das Ammoniumchlorid in der Kulturlösung verwertet. Durch die Bevorzugung des Glutamats als N-Quelle gegenüber Ammoniumchlorid, blieb die Ammonium-Ionenkonzentration während des Wachstums der Kultur über 6 Stunden lang konstant.

Wie die Abb. 4 zeigt, setzte die derepressive Ureasebildung erst nach Verbrauch des Glutamats und des Ammoniaks ein. Die spezifische Aktivität der Urease stieg im Verlaufe des 18stündigen Versuches von 4 E/g auf 250 E/g an. Die Aktivität der synthetischen NADP-GluDH sank dagegen im gleichen Zeitraum von 75 E/g auf 34 E/g ab. Im Gegensatz zur Urease begann die Synthese der NAD-GluDH und der Glutamin-Synthetase bereits nach Verbrauch des Glutamats. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich noch 1 µmol $NH_4^+$ je ml in der Nährlösung.

Trägt man die spezifischen Aktivitäten der NAD-GluDH zur Glutamin-Synthetase gegeneinander auf, so erkennt man, daß eine lineare Abhängigkeit der Enzymbildung unter N-Mangel besteht (Abb. 5). Dieses Ergebnis stützt den Befund, daß nach Anzucht mit verschiedenen Substraten das Verhältnis der NAD-GluDH zur Glutamin-Synthetase konstant bleibt (Tab. 6). Im Gegensatz dazu ist auch in diesem Versuch eine Abhängigkeit der Ureasebildung

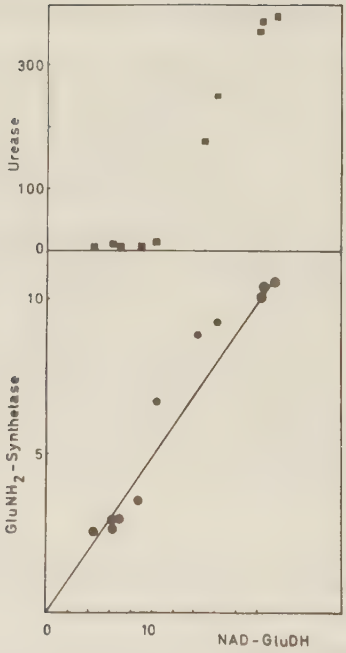



Abb. 5: Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der NAD-Glutamat-Dehydrogenase zur Glutamin-Synthetase und zur Urease während der Inkubation von Hydrogenomonas H16 unter N-Mangel

Versuchsbedingungen wie Abb. 4

von der Synthese der NAD-GluDH nicht erkennbar (Abb. 5).

Die an Hydrogenomonas H16 gemachten Befunde lassen erkennen, daß neben der Urease auch die NAD-GluDH und die Glutamin-Synthetase in Abwesenheit einer N-Quelle synthetisiert werden. Die NAD-GluDH und die Glutamin-Synthetase unterliegen dabei einer parallelen Derepression, während die Urease unabhängig von diesen beiden Enzymen reguliert wird. Die NADP-GluDH hat dagegen unabhängig von der Art der angebotenen Substrate nur in Anwesenheit von Ammonium-Ionen hohe spezifische Aktivitäten. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen darüberhinaus, daß die Bildung der Urease und die Synthese der NAD-GluDH und der Glutamin-Synthetase durch verschiedene Substanzen reprimiert wird: Mit Glutamat als alleiniger N-Quelle wurde nur die Urease nicht aber die NAD-GluDH oder die Glutamin-Synthetase gebildet. Die Synthese der Urease begann beim Wachstum von H16 mit einer begrenzenden Menge an Ammoniak und Glutamat erst nach Verbrauch beider Stickstoffquellen, während die NAD-GluDH-Synthese und die Glutamin-Synthetasebildung bereits nach Verbrauch der Glutaminsäure einsetzte.

c) Einfluß von Wasserstoff auf die Glutamatverwertung

Nach chemolithotrophem Wachstum von Hydrogenomonas H16 erfolgt unter Luft eine schnelle Adaption an Glutamat als C-Quelle, während sie unter Knallgas (80% Wasserstoff und 20% Sauerstoff) unterbleibt (GOTTSCHALK 1965). Es wurde nun geprüft, inwieweit die Glutamat-Dehydrogenase an diesem Regulationseffekt beteiligt ist.

Die Unterdrückung der Glutamatverwertung könnte auf einer Hemmung schon vorhandener Enzyme oder auf der Repression der Enzymsynthese durch Wasserstoff beruhen. Zur Klärung der Frage, ob Wasserstoff die Glutamatverwertung hemmt, wurde H16 mit Glutamat angezogen, aus der exponentiellen Phase geerntet, gewaschen, resuspendiert ($E_{550}$ = 0,6) und unter Knallgas + Stick-

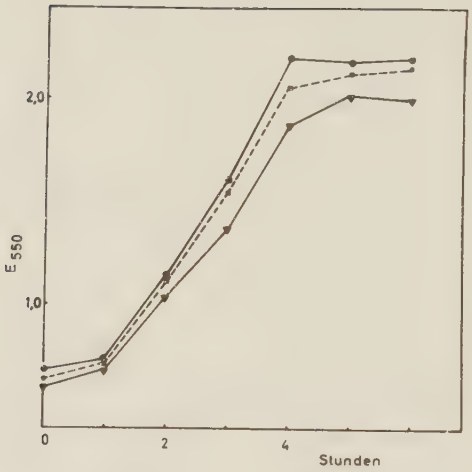



Abb. 6: Wachstum von Hydrogenomonas H16 mit Glutamat unter Knallgas und unter Luft

H16 wurde mit Glutamat (3 g/l) als C- und N-Quelle angezogen und bei einer Extinktion von 0,6 (E = 500 nm) geerntet, gewaschen und in Minerallösung mit Glutamat (10 µmole/ml) resuspendiert und unter Luft und unter Knallgas bei 28°C inkubiert. Jede Stunde wurden die Gefäße mit dem Gasgemisch durchströmt. Die Trübung der entnommenen Proben wurde nach dem Verdünnen (1 : 10) bei 550 nm gemessen.

▲——▲ Luft, ●——● 70% $H_2$ + 20% $O_2$ + 10% $CO_2$
■- - -■ 70% $H_2$ + 20% $O_2$ + 10% $N_2$

Tab. 7: Spezifische Aktivitäten der Glutamat-Dehydrogenase nach Wachstum von Hydrogenomonas H16 unter autotrophen und heterotrophen Bedingungen

| C- und Energie-Quelle | N-Quelle | spez. NAD-GluDH Aktivität | spez. NADP-GluDH Aktivität |
|---|---|---|---|
| $H_2$, $CO_2$ | $NH_4Cl$ | 6,8 | 74 |
| Fructose | $NH_4Cl$ | 7,4 | 80 |

Hydrogenomonas H16 wurde a) unter Knallgas (80% $H_2$ + 10% $O_2$ + 10% $CO_2$) und b) mit Fructose (5 mg/ml) als C- und Energiequelle und $NH_4Cl$ als N-Quelle angezogen. Der dritte Ansatz c) enthielt Glutamat (3 mg/ml) als C- und N-Quelle. Die Zellen wurden bei einer Extinktion (550 nm) von a) = 0,3, b) = 0,5, c) = 0,9 geerntet. Die spezifischen Enzymaktivitäten der NADP- und der NAD-GluDH sind angegeben in µmole $NH_3$/min/g Protein.

stoff, Knallgas + Kohlendioxyd und unter Luft mit Glutamat inkubiert. Das Wachstum der Kulturen wurde durch stündliche Trübungsmessungen verfolgt. Wie aus Abb. 6 ersichtlich ist, wuchs H16 mit Glutamat unter den drei verschiedenen Gasgemischen etwa gleich gut. In den Ansätzen hatten die drei H16-Kulturen nach fünf Stunden die stationäre Phase erreicht, wobei die Extinktionen (bei 550 nm) der Suspensionen zwischen 2,0 und 2,3 lagen. Das heißt, daß Wasserstoff weder die Verwertung von Glutamat als C-Quelle (Wachstum mit Glutamat + Wasserstoff + Sauerstoff + Stickstoff) noch als N-Quelle (Wachstum mit Glutamat + Wasserstoff + Sauerstoff + Kohlendioxyd) hemmt.

Wachstumsversuche hatten ergeben, daß H16 unter einer Gasatmosphäre von 10% Kohlendioxyd, 20% Sauerstoff und 70% Wasserstoff Glutamat gut als N-Quelle nutzen kann. Offenbar reprimiert Wasserstoff die Glutamat-Dehydrogenasebildung nicht. Dieser Befund konnte durch enzymologische Untersuchungen bestätigt werden. Hydrogenomonas H16 wurde autotroph und heterotroph an-

gezogen und die spezifischen Aktivitäten der Glutamat-Dehydrogenase bestimmt (Tab. 7). Unter chemolithotrophen Bedingungen betrug die spezifische Aktivität der NAD-GluDH 6,8 E/g und unterschied sich damit nur unwesentlich von den Werten, die unter heterotrophen Bedingungen mit Fructose/$NH_4Cl$ (7,4 E/g) gemessen wurden. Auch die spezifischen Aktivitäten der NADP-GluDH waren unter den verschiedenen Kulturbedingungen etwa gleich hoch (74 bzw. 80 E/g). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen erkennen, daß Wasserstoff die Verwertung des Glutamats als N-Quelle weder hemmt noch reprimiert.

## II. Verwertung von Pyrimidinen durch Knallgasbakterien

Nach der Vorstellung von DeTURK (1955) wird die unter N-Mangel einsetzende Ureasesynthese durch Harnstoff induziert, der aus dem endogenen Abbau zelleigener Nucleinsäuren freigesetzt wird. Diese Erklärung gab den Anstoß zur Durchführung von Untersuchungen bei Hydrogenomonas H16, die klären sollten, ob beim Abbau von Purinen und Pyrimidinen Harnstoff freigesetzt wird und ob die Urease dabei induziert wird. Die Nutzung von Purinderivaten durch Knallgasbakterien ist kürzlich von AMMAN und REED (1967) und von KALTWASSER (1968 a und b) näher untersucht worden. Dabei zeigten die Untersuchungen an Hydrogenomonas H16, daß Adenin, Guanin, Xanthin, Hypoxanthin, Harnsäure und Allantoin als N-Quelle gut verwertet werden. Beim Wachstum mit Harnsäure wird aber trotz großer Mengen an gebildetem Harnstoff die Ureasebildung nicht induziert.

An zwei typischen Vertretern der Knallgasbakterien, Hydrogenomonas H16 und Hydrogenomonas facilis, wurden die Abbauwege der Pyrimidinderivate und die Bedingungen, die zur Bildung der Abbauenzyme führen, untersucht.

### 1. Verwertung von Cytosin und Uracil durch Hydrogenomonas H16 und Hydrogenomonas facilis

Wachstumsversuche hatten ergeben, daß H. facilis neben Cytosin auch Uracil und Thymin als Stickstoffquelle verwerten kann. Die Hydrogenomonasstämme H1, H2, H16 und H20 dagegen wuchsen nur mit Cytosin und erreichten dabei nur eine geringere Zelldichte, obgleich ihnen dieses Substrat in der gleichen Konzentration wie H. facilis zur Verfügung stand. Diese Beobachtung führte zu der an H16 geprüften Vermutung, daß diese Stämme lediglich Cytosin zu desaminieren, das verbleibende Pyrimidinsystem im Gegensatz zu H. facilis jedoch nicht zu spalten vermögen.

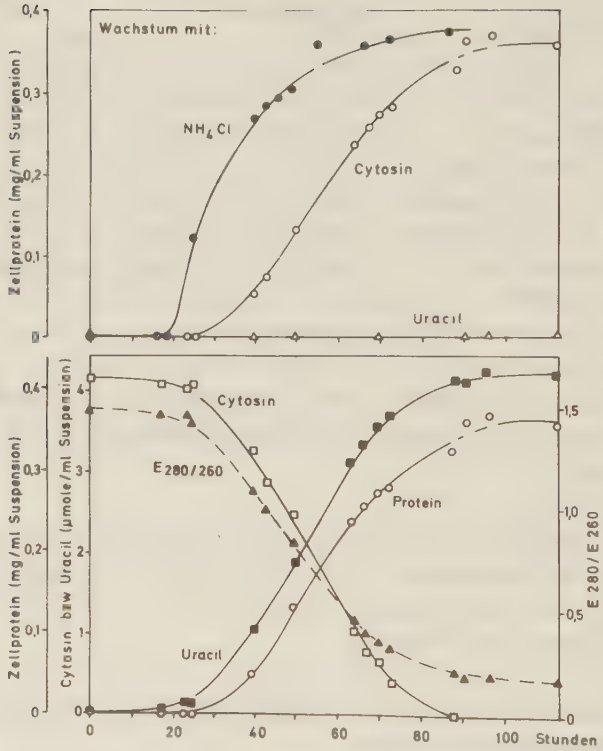



Abb. 7a und b: Wachstum von Hydrogenomonas H16 mit Cytosin, Uracil und Ammoniumchlorid als N-Quelle

a. Änderungen des Proteingehaltes der Suspension. In einem 2 l Rührkolben wurden je 1 l fructosehaltiges Mineralmedium, welches 4 µmol Ammoniumchlorid, Cytosin bzw. Uracil/ ml enthielt, mit Zellen beimpft, die in $NH_4Cl$-Medium herangezogen worden waren, unter kräftigem Rühren belüftet und bei 28°C inkubiert.
b. Bildung von Uracil während des Wachstums mit Cytosin. Versuchsbedingungen wie bei 7a.

a) Nutzung von Cytosin als N-Quelle durch Hydrogenomonas H16 und H. facilis

Bei dem in Abb. 7 dargestellten Experiment wurden Zellen von Hydrogenomonas H16 mit Fructose als Kohlenstoffquelle und äquimolaren Mengen an Ammoniumchlorid, Cytosin und Uracil inkubiert. Dabei war die verabreichte Stickstoffmenge (4 µmole/ml) so berechnet, daß sie das Wachstum der Kultur vorzeitig begrenzte. Mit Uracil wurde kein Zellwachstum beobachtet. Mit Cytosin wuchsen die Zellen zwar langsamer als mit Ammoniumchlorid, jedoch wurde in beiden Fällen bis zum Eintritt in die stationäre Wachstumsphase etwa die gleiche Menge Protein je ml Nährlösung gebildet, obgleich im Cytosinansatz die dreifache N-Menge zugesetzt worden war. Vermutlich wurde also nur eines der drei N-Atome des Cytosins für das Zellwachstum verwertet.

In einer Nährlösung, die Stickstoff in begrenzender Menge enthält, bilden Zellen von Hydrogenomonas je mol verwertbaren Stickstoffs etwa 50 bis 60 g Protein und zwar unabhängig davon, ob er als Ammoniumchlorid oder in organischer Bindung verabreicht wurde (Tab. 14). Durch Messung des erreichten Proteingehaltes läßt sich daher feststellen, ob und in welchem Umfange Stickstoffverbindungen von den Zellen genutzt werden können. Entsprechende Untersuchungen an Hydrogenomonas H16 und H. facilis ergaben, daß beide Organismen mit Ammoniumchlorid etwa 47 g Protein je mol Substrat bildeten, während sich bei H16 mit Cytosin 57 g/ mol und bei H. facilis mit Cytosin der dreifache Proteingehalt (167 g/ mol) fand (KALTWASSER und KRÄMER 1968). Uracil wurde durch H16 nicht, durch H. facilis dagegen mit einer Ausbeute von 121 g/ mol verwertet. Auch diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß H. facilis Uracil und Cytosin vollständig abzubauen vermag, H16 dagegen nur eines der drei N-Atome des Cytosins. Diese Vorstellung bestätigte sich bei dem in Abb. 8 wiedergegebenen Versuch. Hierbei wurden die Zellen von H. facilis in eine fructosehaltige Nährlösung eingeimpft, die Cytosin bzw. Uracil als wachstumsbegrenzende N-Quelle

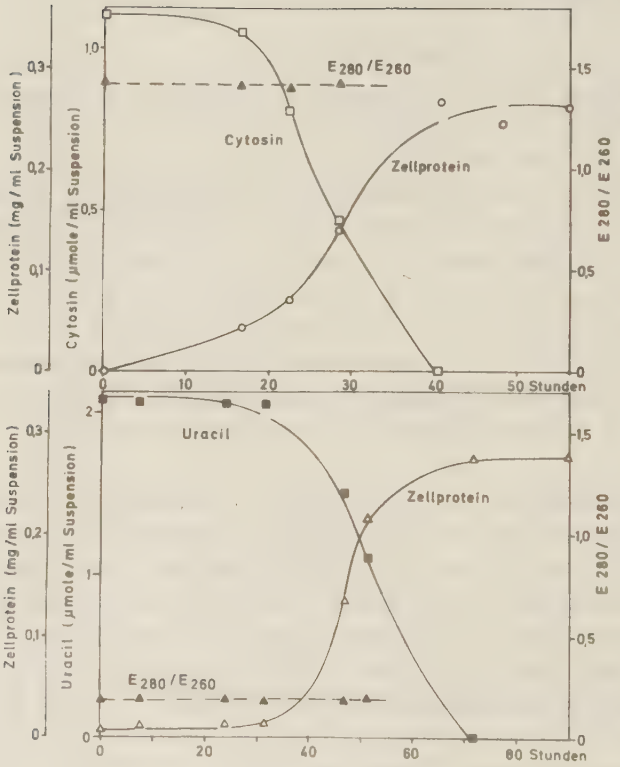



Abb. 8: Wachstum von Hydrogenomonas facilis mit Cytosin bzw. Uracil als N-Quelle

Unter den in Abb. 7 beschriebenen Bedingungen wurden die Zellen mit 1,33 µmolen Cytosin/ml (a) und 2 µmolen Uracil (b) herangezogen.

enthielt. Der Verlauf des Wachstums wurde durch Messung der Trübung und des Proteingehaltes verfolgt. Im Zentrifugationsüberstand wurde darüber hinaus in 0,1 N HCL der Quotient aus der bei 280 nm und 260 nm gemessenen Extinktion ermittelt. Das Cytosin war innerhalb von 40 Stunden (Abb. 8a), das Uracil innerhalb von 70 Stunden (Abb. 8b) verbraucht. In beiden Wachstumsversuchen zeigte das Verhältnis von E 280/ E 260 bis zu diesem Zeitpunkt keine signifikante Änderung; mit Cytosin wurde lediglich eine schwache Abnahme von 1,44 auf 1,40 und mit Uracil eine unbedeutende Zunahme von 0,18 auf 0,19 gemessen. Der Verbrauch dieser beiden Pyrimidine ist demnach nicht von einer Anhäufung eines im ultravioletten Licht absorbierenden Folgeproduktes begleitet.

b) Ausscheidung von Uracil durch Hydrogenomonas H16 während des Wachstums mit Cytosin

Im Gegensatz zu H. facilis verwertet H16 nur Cytosin, aber nicht Uracil als N-Quelle. Es war deshalb zu erwarten, daß beim Wachstum von H16 mit Cytosin das Desaminierungsprodukt Uracil im Medium angehäuft wird. Abb. 7b gibt die Änderung der UV- Absorption im Überstand während des Wachstums von H16 mit Cytosin wieder. Das Verhältnis E 280/ E 260, das bei reinem Cytosin 1,53 beträgt, sank im Verlaufe des viertägigen Zellwachstums in der Kulturflüssigkeit von 1,49 auf 0,18 ab; das entspricht dem Wert des reinen Uracils von 0,17. Während dieses Versuches waren die eingesetzten 4,18 µmole Cytosin je ml völlig verbraucht und statt dessen 4,15 µmole Uracil je ml gebildet worden.

Nach dem Eintritt in die stationäre Wachstumsphase wurde aus der überstehenden Nährlösung, in der chromatographisch kein Cytosin mehr nachweisbar war, das gebildete Uracil ausgefällt und durch mehrfaches Umkristallisieren aus verdünnter Schwefelsäure gereinigt. Die erhaltene Substanz wurde auf Grund der folgenden Untersuchungen als Uracil identifiziert: Die spezifi-

sche Extinktion bei 260 nm war identisch mit derjenigen von synthetischem Uracil. Ebenso stimmte der $R_f$-Wert im Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Chloroform-Methanol 1 : 1) von 0,77 mit dem von synthetischem Uracil überein und unterschied sich deutlich vom $R_f$-Wert des Cytosins (0,49). Außerdem erwiesen sich die beiden Substanzen auf Grund ihrer UV-Absorptionsspektren bei saurem und alkalischem pH-Wert sowie ihrer IR-Absorptionsspektren in KBr (Abb. 9) als identisch.*

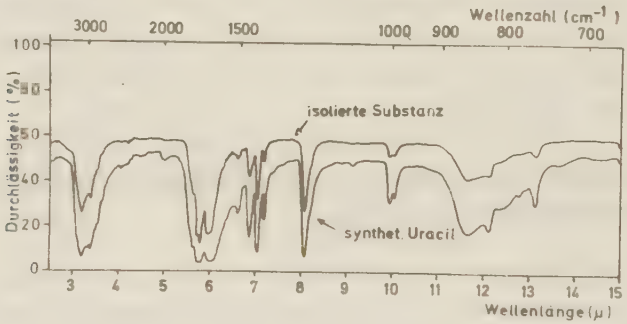



Abb. 9: IR-Absorptionsspektren von Uracil

Obere Kurve: Uracil, welches nach Wachstum von Hydrogenomonas H16 mit Cytosin als N-Quelle (Versuch Abb. 7) isoliert worden war. Untere Kurve: Spektrum von synthetischem Uracil; beide Substanzen in KBr.

c) Verfahren zur Bestimmung der Cytosin-Desaminase

Die Cytosin-Desaminase (Cytosin Aminohydrolase, E. C. 3. 5. 4. 1.) katalysiert die Desaminierung von Cytosin zum Uracil. Von KREAM und CHARGAFF (1952 b) wurde das Enzym aus Bäckerhefe isoliert, gereinigt und hinsichtlich seiner enzymatischen Eigenschaften näher untersucht. Die spezifische Enzymaktivität wurde dabei durch Messung der UV-Absorption des papier-chromatographisch identifizierten und gereinigten Uracils ermittelt.

* Die chromatographischen und IR-spektrographischen Analysen führte Herr Dr. H.-M. Schiebel durch.

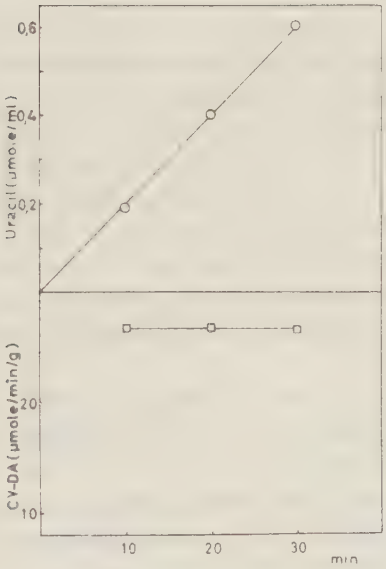



Abb. 10: Bestimmung der spezifischen Cytosin-Desaminase-Aktivität im zellfreien Extrakt von Hydrogenomonas H16 durch Messung der gebildeten Uracilmenge

Das Reaktionsgemisch enthielt 2,7 ml 0,05 M Tris-Puffer (pH 8,0); 12 µmole Cytosin; 0,1 ml (1,56 mg Protein) Rohextrakt aus Zellen, die mit Cytosin als N-Quelle gewachsen waren und Aqua dest. ad 3 ml. Der Ansatz wurde bei 28°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden 0,2 ml Probe mit 0,2 ml 10%iger TCE versetzt, mit 3,6 ml 0,1 N HCl verdünnt und drei Minuten lang bei 10 000 g zentrifugiert. Zur photometrischen Bestimmung des Uracils wurde der Zentrifugationsüberstand mit 0,1 N HCl 1 : 1 verdünnt.

In vereinfachter Form konnte diese Methode auch für die Messung des Enzyms in Extrakten aus Hydrogenomonas H16 angewendet werden.

Nach LORING (1955) lassen sich in einem binären Gemisch von Pyrimidinen und Purinen die Einzelkomponenten quantitativ photometrisch bestimmen. Da H16 Cytosin nur bis zum Uracil abbaut, kann die entstehende Menge Uracil direkt durch Messung der Extinktion bei 280 nm und bei 260 nm ermittelt werden. Wie die Abb. 10 zeigt, verlief die Spaltung des Cytosins unter diesen Bedingungen durch Extrakte von H16 30 Minuten lang linear. Die nach dieser Methode gemessene spezifische Aktivität von 26 E/g lag etwas unter dem Wert, der im gekoppelten optischen Test mit Glutamat-Dehydrogenase als Hilfsenzym gemessen wurde (33 E/g).

Darüber hinaus ließ sich das Enzym bei H16 und bei anderen Bakterien auch im gekoppelten Test nach KALTWASSER und SCHLEGEL (1966) bestimmen. Dabei wurden die bei der Cytosinspaltung freigesetzten Ammonium-Ionen mit α-Ketoglutarsäure und $NADH_2$ als Hilfssubstrate und mit Glutamat-Dehydrogenase als Hilfsenzym bestimmt. Die optimale Cytosinkonzentration lag unter diesen Bedingungen bei 50 bis 60 µmolen Cytosin je Ansatz (3 ml). Die eingesetzte Rohextraktmenge war in einem Bereich von 0,2 bis 1,0 mg Protein je Ansatz (3 ml) der Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms proportional. 12 µmole $N_2S$ je 3 ml, die zur Hemmung der unspezifischen $NADH_2$-Oxidase zugesetzt wurden, hemmten die Cytosin-Desaminase nicht.

d) <u>Induktive Bildung der Cytosin-Desaminase bei Hydrogenomonas H16</u>

Bei dem in Abb. 11 dargestellten Experiment wurden mit Fructose und Ammoniumchlorid angezogene Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase (E = 1,2) geerntet, gewaschen und in einer Fructose enthaltenden Nährlösung resuspendiert, die 10 µmole Cytosin/ml als N-Quelle enthielt. Unter fortlaufender Probeentnahme wurde die Suspension bei 28°C inkubiert und durch magnetisches

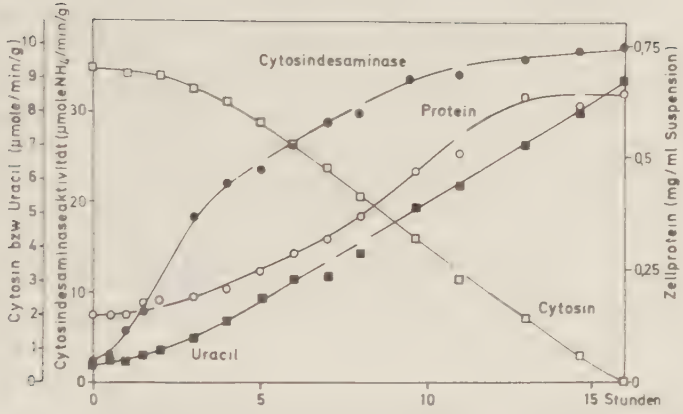



Abb. 11: Induktive Bildung von Cytosin-Desaminase in Hydrogenomonas H16

Mit Fructose und Ammoniumchlorid herangezogene Zellen wurden aus der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, gewaschen und in 3 Liter fructosehaltigem Mineralmedium resuspendiert, welches 9,2 µmole Cytosin/ ml enthielt. Aus der durch magnetisches Rühren belüfteten und bei 28°C inkubierten Suspension wurden Proben von 100 bis 200 ml entnommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert, gewaschen und in 0,066 M Phosphatpuffer der Ultraschallbehandlung unterworfen. Im Überstand wurde mit Hilfe des gekoppelten optischen Testes die in Gegenwart von Cytosin je min und pro g Protein freigesetzte Ammoniakmenge bestimmt.

Rühren kräftig belüftet. Wie bereits in dem in Abb. 7b beschriebenen Experiment wurde auch hier im Zentrifugationsüberstand die Abnahme des Cytosins und die simultane Bildung von Uracil beobachtet. Die abzentrifugierten Zellen wurden zweimal gewaschen, der Ultraschallbehandlung unterworfen und 20 Minuten lang bei 10 000 g abzentrifugiert. Im so erhaltenen Rohextrakt wurde bei 30°C mit Hilfe des optischen Testes die Menge des nach Cytosinzugabe je Minute und je Gramm Protein freigesetzten Ammoniaks ermittelt. Wie aus Abb. 11 hervorgeht, stieg im Verlauf der 16-stündigen Inkubationszeit die anfängliche spezifische Aktivität der Zellen von 2 E/g auf 37 E/g an. Dieser 18fache Anstieg der spezifischen Enzymaktivität macht deutlich, daß während der Inkubation mit Cytosin und Fructose eine induktive Bildung von Cytosin-Desaminase in den Zellen von Hydrogenomonas H16 stattgefunden hat.

## 2. Abbau von Uracil durch H. facilis

Aus den vorangegangenen Experimenten ging eindeutig hervor, daß H. facilis beim Wachstum mit Cytosin als N-Quelle alle drei N-Atome des Cytosinmoleküls in das Zellprotein einzubauen vermag. Weitere Versuchsreihen sollten die Frage klären, auf welchem Weg der Organismus das durch Desaminierung des Cytosins entstehende Uracil abbaut.

Uracil kann einerseits nach einem oxidativen, andrerseits nach einem reduktiven Mechanismus abgebaut werden (Abb. 12). In Corynebacterium und Mycobacterium (HAYAISHI und KORNBERG 1951 u. 1952) und in zellfreien Extrakten eines nicht näher identifizierten Bodenbakteriums Stamm U 1 (WANG und LAMPEN 1952) führt der einleitende oxidative Angriff zur Bildung von Barbitursäure aus Uracil bzw. 5-Methylbarbitursäure aus Thymin. Die Oxidation beider Verbindungen wird durch ein und dasselbe Enzym, die Uracil-Thymin-Oxidase, katalysiert. Die Barbitursäure wird durch die Barbiturase (Barbituraminohydrolase) in Malonat und Harnstoff und die 5-Methylbarbitursäure in Methylmalonat und Harnstoff zerlegt (BIGGS und DOUMAS 1963).

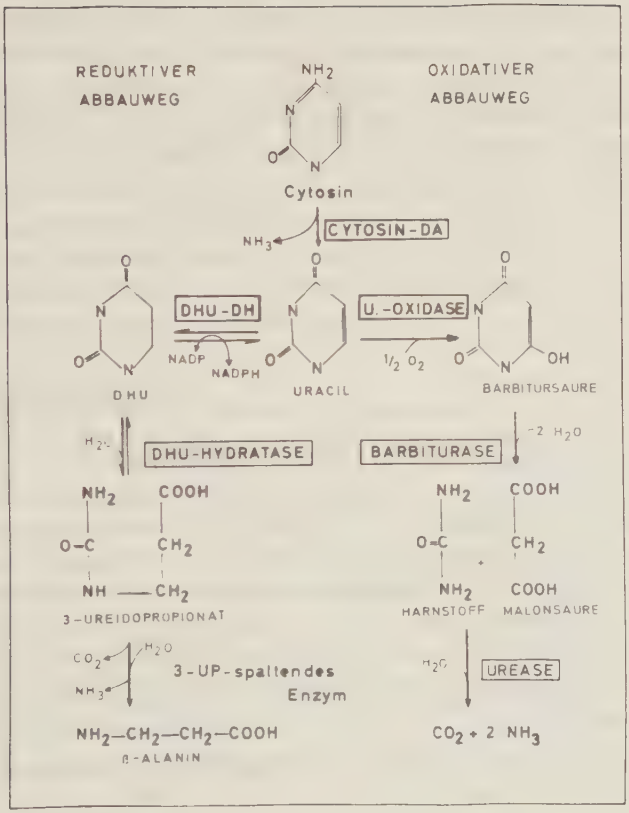



Abb. 12: Abbauwege des Cytosins bei Bakterien
( nach HAYAISHI und KORNBERG 1952 und CAMPBELL 1958 )

| N-Quelle | C-Quelle | Wachstum | $E_{550}$ | Protein mg/Ansatz |
|---|---|---|---|---|
| Uracil | Fructose | ++ | 2,9 | - |
| | Uracil | (+) | 0,3 | 0,57 |
| Cytosin | Fructose | ++ | 2,9 | - |
| | Cytosin | (+) | 0,1 | 0,43 |
| DHU | Fructose | ++ | 3,2 | - |
| | DHU | (+) | 0,2 | 0,63 |
| 3-UP | Fructose | ++ | 3,2 | - |
| | 3-UP | (+) | 0,2 | 0,68 |
| ß-Alanin | Fructose | ++ | 4,2 | - |
| | ß-Alanin | + | 1,5 | 3,3 |
| Thymin | Fructose | ++ | 3,1 | - |
| | Thymin | - | 0,1 | 0,06 |
| 5-M-Cytosin | Fructose | ++ | 3,4 | - |
| | 5-M-Cytosin | (+) | 0,1 | 0,34 |
| $NH_4Cl$ | Fructose | ++ | 3,1 | - |
| | keine | - | 0,05 | 0,08 |
| Orotsäure | Fructose | + | 0,85 | - |
| | Orotsäure | - | 0,05 | 0,07 |
| Barbitursäure | Fructose | - | 0,05 | - |
| | Barbitursäure | - | 0,05 | 0,08 |

Tab. 8: Substratverwertung durch H. facilis

Mit 0,1 ml Suspension einer Schrägröhrchenkultur wurden 10 ml Nährlösung angeimpft. Die fructosehaltigen Kölbchen enthielten 10 µmole der jeweiligen N-Quelle je ml. Die Ansätze, in denen die Verwertung der verschiedenen Substrate als C-Quelle getestet werden sollte, enthielten jeweils 20 µmole des Substrates ohne zusätzliche Fructose. Der Versuch wurde nach 7 Tagen ausgewertet.

Zeichenerklärung: siehe Tab. 5

In tierischen und in pflanzlichen Geweben und in einer Vielzahl von Mikroorganismen wird Uracil mit $NADH_2$ oder $NADPH_2$ als Coenzym durch die Dihydrouracil-Dehydrogenase (DHU-DH) zum Dihydrouracil reduziert. Die Dihydrouracil-Hydratase (DHU-Hydrase) katalysiert die hydrolytische Spaltung des Pyrimidinringes zu 3-Ureidopropionsäure. Die 3-Ureidopropionsäure (3-UP) wird anschließend zu ß-Alanin, Kohlendioxid und Ammoniak katabolisiert. Entsprechend wird Thymin über Dihydrothymin und 3-Ureidoisobuttersäure zu 3-Aminoisobuttersäure, Kohlendioxid und Ammoniak abgebaut. In Clostridium oroticum unterliegt auch die Orotsäure einem reduktiven Abbaumechanismus. Aus Orotsäure entsteht dabei über L-Dihydroorotsäure und Carbamyl-L-aspartat das Carbamylphosphat und L-Aspartat.

a) Substratverwertung

In der Tab. 8 sind Wachstumsversuche mit H. facilis zusammengestellt, die prüfen sollten, welche der möglichen Intermediärprodukte des reduktiven und des oxidativen Cytosinabbaues der Organismus als N-Quelle oder als C-Quelle verwerten kann. Die verschiedenen Substrate wurden einmal als einzige C- und N-Quelle und zum anderen nur als N-Quelle zugesetzt. Alle Substrate außer Barbitursäure wurden gut als N-Quelle verwertet. Wurden die Substrate ohne zusätzliche C-Quelle angeboten, so konnte nur mit ß-Alanin gutes und mit Cytosin, Uracil, Dihydrouracil und 3-Ureidopropionat schwaches Wachstum beobachtet werden.

b) Substratoxidation

Inkubiert man gewaschene, mit Uracil herangezogene Zellen von H. facilis mit Uracil, Dihydrouracil oder ß-Alanin in einer Salzlösung, so beobachtet man eine der endogenen Atmung gegenüber erhöhte Sauerstoffaufnahme, die manometrisch gemessen werden kann. In Abb. 13a und b sind zwei Versuche wiedergegeben, die die Fähigkeit zur Oxidation und die Oxidationsrate von verschiedenen Substraten durch ganze Zellen von H. facilis unter-

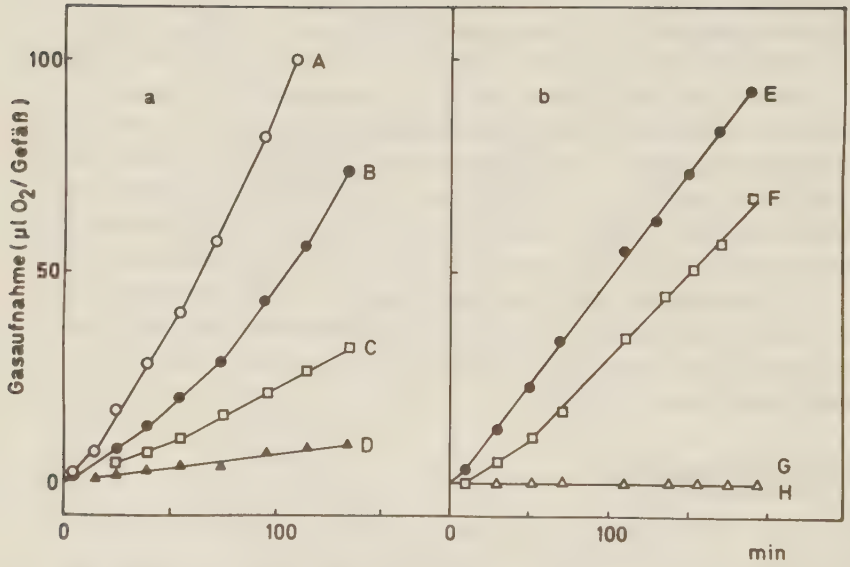



Abb. 13a und b: Oxidation der Intermediärprodukte des oxidativen und des reduktiven Cytosinabbaues durch intakte Zellen von H. facilis

a. Auf Uracil gewachsene Zellen von H. facilis wurden aus der exponentiellen Phase geerntet, gewaschen und in Mineralsalzlösung (pH 7,0) resuspendiert.
Reaktionsgemisch: 2,0 ml Mineralsalzlösung (pH 7,0); 0,2 ml Zellsuspension (5,28 mg Protein); 0,2 ml einer Lösung von ß-Alanin (A), DHU (B), Uracil (C) und 3-UP (D) - je 5 µmole; 0,2 ml 20%ige KOH im Zentralzylinder.

b. Das Reaktionsgemisch enthielt: 0,2 ml einer Suspension von Cytosinzellen (6,0 mg Protein); 2,0 ml Mineralsalzlösung; 0,2 ml (je 5 µmole) einer Lösung von Cytosin (E), Uracil (F), Barbitursäure (G) und Malonsäure (H); 0,2 ml 20%ige KOH im Zentralzylinder.

Tab. 9: Papierchromatographische Analyse zellfreier Extrakte von H. facilis nach 5-stündiger Inkubation mit Intermediärprodukten des reduktiven und des oxidativen Cytosinabbauweges

| Substrate | Im zellfreien Extrakt nachgewiesene Substanzen | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Uracil | DHU | 3-UP | ß-Alanin | Barbitursäure |
| **Uracil** | + | (+) | + | + | - |
| **DHU** | - | + | (+) | + | - |
| **3-UP** | - | (+) | + | + | - |
| **ß-Alanin** | - | - | - | + | - |
| **Barbitursäure** | - | - | - | - | + |

Zellen von H. facilis wurden in fructosehaltigem Nährmedium mit Uracil als N-Quelle angezogen und aus der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. 1 ml des aus diesen Zellen hergestellten Extraktes wurde mit 0,1 ml 0,5 M Phosphatpuffer (pH 7,4), 10 µmolen $MgCl_2$, je 30 µmolen Barbitursäure, Uracil, DHU, 3-UP oder ß-Alanin im Gesamtansatz von 3 ml bei 30°C inkubiert. Nach 5 Stunden wurde je 1 ml des Reaktionsgemisches mit 3 ml 96%igem Äthanol versetzt und abzentrifugiert (20 min/10 000 g). Von den Zentrifugationsüberständen wurden je 50 bis 100 µl auf Chromatographiepapier 2034 b Mgl (S & S) aufgetragen und wie in Abb. 14 beschrieben chromatographiert und identifiziert.

+ = deutliche Flecken auf dem Chromatogramm

(+) = schwache Flecken

- = kein Nachweis

suchen sollte. Die Zellen wurden in Fructose-Mineralmedium mit Uracil bzw. Cytosin als N-Quelle angezogen, aus der exponentiellen Phase geerntet, gewaschen und in Phosphatpuffer resuspendiert. Jeder Ansatz der Warburgversuche enthielt äquimolare Mengen des jeweiligen Substrates und gleiche Mengen an gewaschenen Zellen. Uracil, Dihydrouracil, 3-Ureidopropionat und ß-Alanin wurden sofort ohne lag-Phase oxidiert (Abb. 13a). Die Rate der Sauerstoffaufnahme (µl $O_2$/Std./g Protein) war dabei für ß-Alanin wesentlich höher als für Uracil, Dihydrouracil oder

für 3-Ureidopropionat. Barbitursäure oder Malonsäure, die Intermediärprodukte des oxidativen Uracilabbaues, wurden während einer Inkubationszeit von 200 Minuten von Cytosinzellen nicht oxidiert (Abb. 13b).

c) Papierchromatographische Identifizierung der Intermediärprodukte

Der endgültige Nachweis, daß H. facilis Uracil nach dem reduktiven Mechanismus abbaut, gelang mit der papierchromatographischen Isolierung und Identifizierung der Intermediärprodukte. H. facilis wurde in Fructose-Mineralmedium mit Uracil als N-Quelle angezogen und aus der logarithmischen Phase geerntet. Der aus diesen Zellen hergestellte zellfreie Extrakt wurde mit Barbitursäure, Uracil, Dihydrouracil, 3-Ureidopropionat oder ß-Alanin bei 30°C inkubiert, nach 5 Stunden mit 96%igem Alkohol versetzt und aliquote Teile des zellfreien Überstandes chromatographiert. Als Vergleich wurde ein Gemisch aus Uracil, Barbitursäure, Dihydrouracil, 3-Ureidopropionat auf einem zweiten Chromatogramm unter den gleichen Bedingungen chromatographiert (Abb. 14b). Die Identifizierung der enzymatischen Reaktionsprodukte und der eingesetzten Substanzen erfolgte nacheinander auf demselben Chromatogramm (FINK et al. 1956). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 9 zusammengestellt. Nach 5 Stunden waren in dem zellfreien Extrakt, der mit Uracil inkubiert worden war, die Intermediärprodukte des reduktiven Abbauweges (Uracil, Dihydrouracil, 3-Ureidopropionat und ß-Alanin) nachweisbar (Abb. 14a); Barbitursäure trat dabei nicht auf. Auch in den Reaktionsansätzen mit Dihydrouracil und 3-Ureidopropionat konnten die nachfolgenden Abbauprodukte 3-Ureidopropionat und ß-Alanin identifiziert werden. In den zellfreien Extrakten, die mit Barbitursäure oder ß-Alanin inkubiert worden waren, ließen sich Uracil, Dihydrouracil und 3-Ureidopropionat nicht nachweisen.

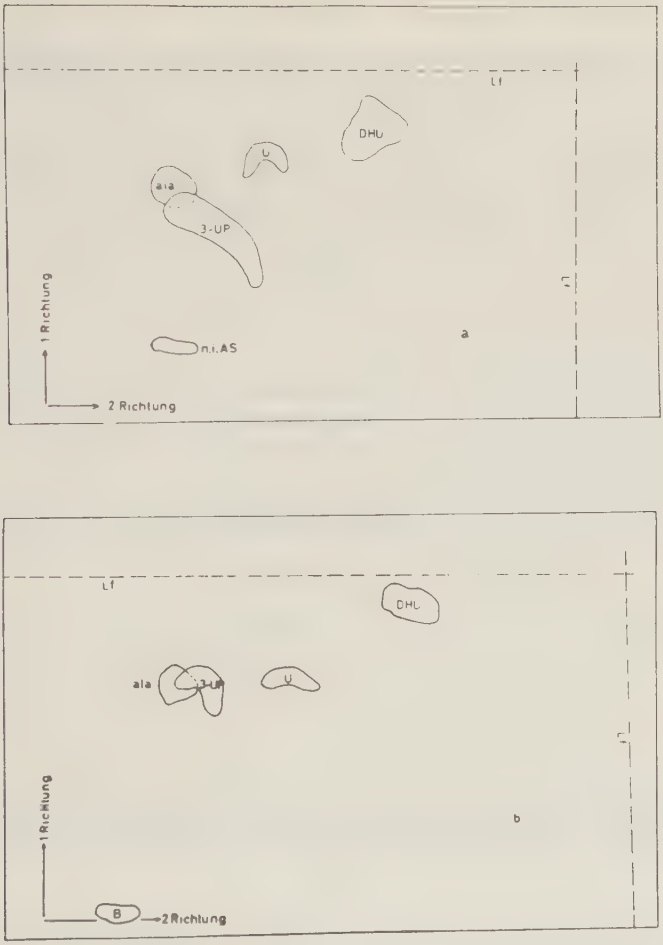

Lf
DHL
U
a1a
3-UP
1 Richtung
n.r.AS
a
2 Richtung
Lf
DHL
a1a
3-UP
U
1 Richtung
b
B
2 Richtung

Abb. 14

Abb. 14 a und b: Zweidimensionales Papierchromatogramm zur Trennung und Identifizierung der Intermediärprodukte des Cytosinabbaues durch H. facilis

a. Ein zellfreier Extrakt von H. facilis wurde 5 Stunden lang mit Uracil inkubiert, anschließend deproteinisiert und zentrifugiert (Versuchsbedingungen s. Tab. 9). 100 µl des Zentrifugationsüberstandes wurden zweidimensional chromatographiert. Die Identifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte auf demselben Chromatogramm. Uracil hat bei 259 nm ein Absorptionsmaximum und gab sich unter der UV-Lampe (260 nm) als dunkler Fleck zu erkennen. ß-Alanin färbte sich mit Ninhydrin rötlich bis violett. Zur vollen Farbentwicklung wurden die Chromatogramme 10 Minuten in einen auf 60°C eingestellten Trockenschrank gehängt. Anschließend wurde das Chromatogramm mit 0,5 N NaOH besprüht und zur Hydrolyse des DHU zur 3-Ureidopropionsäure ca. 1 Stunde feucht hängen gelassen. Nach dem Trocknen wurde zur Identifizierung der Ureidoverbindungen (3-UP und das aus dem DHU entstandene 3-UP) das Chromatogramm mit einer Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd in Äthanol und HCl (1 g p-DABA in 95 ml Äthanol und 5 ml konz. HCl) besprüht, kurz auf 60°C im Trockenschrank erhitzt und je nach der gelblichen Farbentwicklung des Untergrundes nach 2 bis 6 Stunden ausgewertet. Ureidoverbindungen gaben sich dabei als gelbe Flecken (E max = 440 nm), Barbitursäure als orange-roter Fleck zu erkennen. Durch das Besprühen mit dem p-DABA-Reagenz wurde die Ninhydrinfärbung weitgehend zerstört.

Papier: S & S 2043 b, Mgl

Lösungsmittel: 1. Richtung Phenol/ Wasser (3 : 1 - g : v)

2. Richtung Tert. Butanol/ Sec. Butanol/ Wasser (1 : 5 : 5 - v : v : v)

Lf = Lauffront

b. Als Vergleichssubstanzen wurden auf einem zweiten Chromatogramm Uracil (U), Dihydrouracil (DHU), ß-Alanin (ala), 3-Ureidopropionat (3-UP) und Barbitursäure (B) cochromatographiert. Versuchsbedingungen siehe Abb. 14a.

## 3. Untersuchungen zur Regulation des Pyrimidinabbaues bei H. facilis

### a) Oxidation von Pyrimidinderivaten und Intermediärprodukten des Uracilabbaues

In den vorangegangenen Versuchen war gezeigt worden, daß mit Uracil angezogene Zellen von H. facilis ß-Alanin, Uracil, Dihydrouracil und 3-Ureidopropionat oxidierten. Die folgenden Untersuchungen sollten prüfen, ob der Abbau dieser Substrate induzierbar ist.

Abb. 15 gibt einen Versuch wieder, bei dem die Oxidation von Dihydrouracil und ß-Alanin durch intakte Zellen von H. facilis getestet wurde, die mit Ammoniumchlorid bzw. mit Uracil angezogen worden waren. ß-Alanin wurde sowohl von Ammoniumchlorid- als auch von Uracilzellen mit etwa der gleichen Rate der Sauerstoffaufnahme (µl $O_2$/Std./g Protein) oxidiert. Das heißt, daß die Enzyme,die für die Verwertung des ß-Alanins verantwortlich sind, nicht durch ein Intermediärprodukt des Cytosinabbaues induziert zu werden brauchen. Abb. 15b zeigt dagegen die Induzierbarkeit der Dihydrouracil-Oxidation. Mit $NH_4Cl$ angezogene Zellen oxidierten Dihydrouracil während der ersten zwei Stunden des Versuches nicht. Demgegenüber zeigten Zellen, die mit Uracil gewachsen waren, mit Dihydrouracil eine starke Sauerstoffaufnahme. Diese Befunde zeigen, daß die Enzyme des Cytosinabbaues bei H. facilis zum Teil konstitutiv, zum Tei induktiv gebildet werden.

Weitere Untersuchungen zielten auf die Klärung der Frage ab, welchen Einfluß äußere N-Quellen und die Abwesenheit einer N-Quelle auf den Uracilabbau haben. Als charakteristisches Intermediärprodukt des Uracilabbauweges wurde Dihydrouracil ausgewählt und dessen Oxidation durch Zellen, die mit verschiedenen Substraten angezogen worden waren, im Warburgmanometer verfolgt. Abb. 16b gibt die Ergebnisse dieser Untersuchung wieder. Zellen von

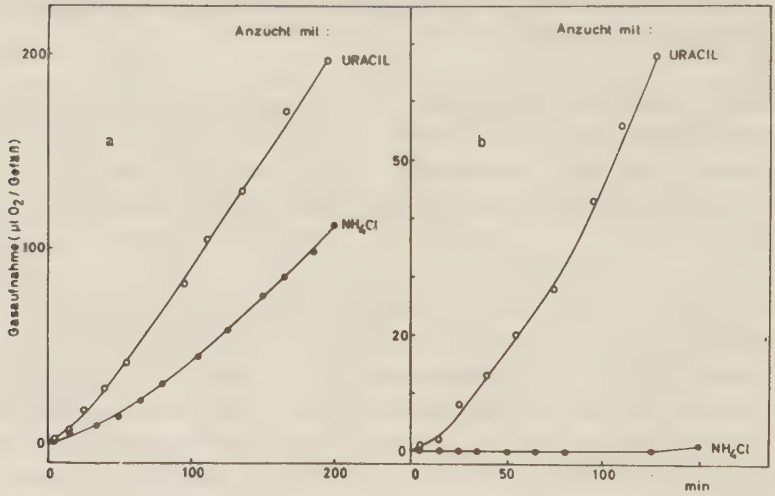



Abb. 15a und b: Oxidation von Dihydrouracil und ß-Alanin durch intakte Zellen von H. facilis nach Anzucht mit Ammoniumchlorid und Uracil

a. H. facilis wurde mit Uracil bzw. $NH_4Cl$ als N-Quelle angezogen und aus der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Versuchsbedingungen wie in Abb. 13. 0,2 ml Zellsuspension enthielten 5,28 mg Protein (Uracil-Zellen) bzw. 5,9 mg Protein ($NH_4Cl$-Zellen). Jeder Ansatz enthielt 10 umole ß-Alanin.

b. Jeder Ansatz enthielt 10 µmole DHU. Versuchsbedingungen wie in Abb. 15a.

H. facilis wurden nach Wachstum mit Uracil, Thymin, Cytosin, Orotsäure und Ammoniumchlorid aus der exponentiellen Phase geerntet, gewaschen und zur manometrischen Messung in einem Phosphatpuffer resuspendiert. Die N-Mangelzellen wurden mit einer begrenzenden Menge an Ammoniumchlorid herangezogen und 10 Stunden nach Erreichen der stationären Wachstumsphase geerntet. Auf Ammoniumchlorid gewachsene und N-Mangelzellen oxidierten das Dihydrouracil während der ersten 150 Minuten des Versuches nicht. Dagegen zeigten nicht nur die mit Cytosin oder Uracil angezogenen Zellen, sondern auch die mit Thymin oder Orotsäure gewachsenen Zellen mit Dihydrouracil als Substrat eine deutliche Sauerstoffaufnahme.

Verfolgt man die Oxidation von Thymin durch N-Mangelzellen und durch Uracil-, Thymin-, Cytosin-, Orotsäure und $NH_4Cl$-Zellen (Abb. 16a), so ergeben sich entsprechende Verhältnisse wie bei der Uracil-Oxidation (Abb. 16b). N-Mangelzellen und mit Ammoniumchlorid angezogene Zellen zeigten mit Thymin wiederum keine Sauerstoffaufnahme. Die Uracil-, Thymin- und Orotsäure-Oxidation setzte dagegen sofort ein, während die Sauerstoffaufnahme durch die mit Cytosin gewachsenen Zellen erst nach 40 Minuten begann. In Gegenwart von Uracil, Thymin, Cytosin und Orotsäure als einziger N-Quelle wird demnach nicht nur die Uracilverwertung, sondern auch die Thyminverwertung induziert.

Wie die in Tab. 11 und 12 zusammengestellten Ergebnisse zeigen, sind die ersten drei Enzyme des Cytosinabbaues in Zellen, die mit Uracil oder mit Thymin angezogen worden waren, voll induziert. Trotzdem oxidierten diese Zellen nur Thymin ohne Anlaufphase (Abb. 16a und b). Die Rate der Dihydrouracil-Oxidation erreichte dagegen erst nach 50 bis 60 Minuten einen konstanten Wert. Auf Cytosin gewachsene Zellen vermochten weder Thymin noch Dihydrouracil sofort zu oxidieren. Diese Befunde weisen darauf hin, daß für die Oxidation von Dihydrouracil eine Permease notwendig ist, die erst in Gegenwart von exogenem Dihydrouracil aber nicht nach Wachstum mit Uracil gebildet wird.

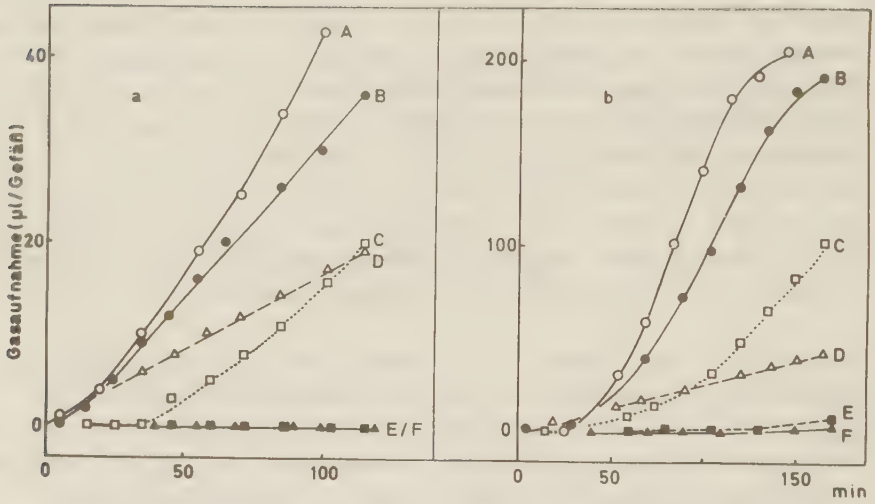



Abb. 16a und b: Oxidation von Thymin und Dihydrouracil durch intakte Zellen von H. facilis nach Wachstum mit Ammoniumchlorid, Uracil, Orotsäure, Thymin, Cytosin und unter N-Mangel

a. H. facilis wurde mit Uracil (A), Thymin (B), Cytosin (C), Orotsäure (D), $NH_4Cl$ (E) und mit einer begrenzenden Menge an $NH_4Cl$ (F) als N-Quelle herangezogen, geerntet, gewaschen und in Mineralsalzlösung (pH 7,0) resuspendiert .

Reaktionsgemisch: 2,0 ml Mineralsalzlösung (pH 7,0); 0,2 ml Zellsuspension; 0,2 ml Thyminlösung (10 µmole); 0,2 ml 20%ige KOH im Zentralzylinder.

Die Zellsuspensionen enthielten folgende Proteinmengen ( in 0,2 ml): A = 1,86 mg; B = 2,2 mg; C = 1,92 mg; D = 2,08 mg; E = 1,88 mg und F = 1,10 mg Protein.

b. Jeder Reaktionsansatz enthielt 10 µmole DHU. Versuchsbedingungen wie in Abb. 16a.

b. Nachweis von Cytosin-Desaminase, Dihydrouracil-Dehydrogenase und Dihydrouracil-Hydrase

Die vorliegenden Untersuchungen lassen die Frage offen, ob Thymin oder Orotsäure den Uracilabbau direkt induzieren oder ob die beiden N-Quellen lediglich über Uracil abgebaut werden und dadurch indirekt eine Induktion der Enzymbildung auslösen. Zur Klärung dieser Frage wurden die ersten drei Enzyme der Abbaukette- die Cytosin-Desaminase (CY-DA), die Dihydrouracil-Dehydrogenase (DHU-DH) und die Dihydrouracil-Hydrase näher untersucht.

Tab. 10: Coenzymspezifität der Dihydrouracil-Dehydrogenase

| Coenzym | Substrat | DHU-DH (umole/min/g) |
|---|---|---|
| NAD | DHU | 0 |
| NADP | DHU | 6,2 |
| $NADH_2$ | Uracil | 0 |
| $NADPH_2$ | Uracil | 15,0 |

Der Testansatz enthielt folgende Komponenten: Zellfreier Extrakt aus Zellen von H. facilis, die mit Uracil gewachsen waren; 0,02 mlCoenzymlösung (je 10 mg/ml); 0,03 ml $MgCl_2$ (0,1 M); Uracil bzw. DHU (8 µmole) und Aqua dest. ad 1 ml.

Cytosin-Desaminase wurde nach der für Hydrogenomonas H16 ausgearbeiteten Methode im gekoppelten optischen Test mit Glutamat-Dehydrogenase als Hilfsenzym bestimmt. Bei der Ausarbeitung einer Methode zur Bestimmung der Dihydrouracil-Dehydrogenase nach CAMPBELL (1957b) zeigte sich, daß das Enzym $NADPH_2$ als Coenzym zur Reduktion des Uracils zum Dihydrouracil benötigt. Mit $NADH_2$ reagierte das Enzym nicht. Wie aus Tab. 10 ersichtlich ist, ist die Reaktion reversibel. NADP-spezifische Dihydrouracil-Dehydrogenasen wurden auch in Rattenleber (FRITZON

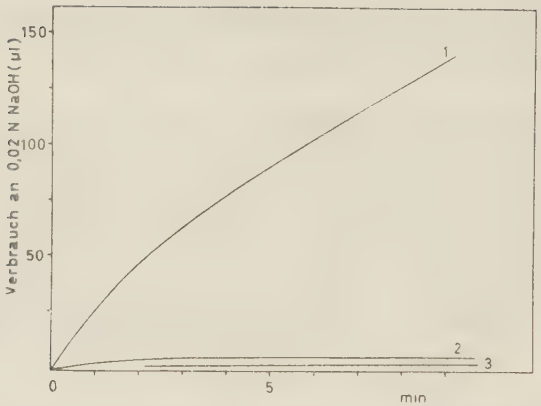



Abb. 17: Titrimetrischer Test zur Bestimmung der Dihydrouracil-Hydrase

1: Reaktionsgemisch: 20 µmole DHU; Rohextrakt (0,3 mg Protein) aus Zellen, die mit Uracil angezogen worden waren; Aqua dest. ad 3 ml. Der pH-Wert wurde mit 0,02 N NaOH auf 7,2 eingestellt und durch Zugabe von NaOH konstant gehalten (Verbrauch an 0,02 N NaOH).

2: ohne DHU; 3: ohne Extrakt

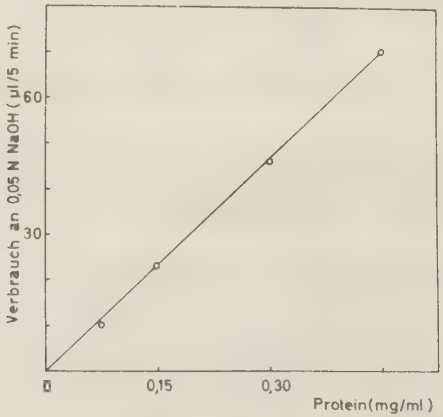



Abb. 18: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Dihydrouracil-Hydrase von der Rohextraktmenge

Test wie in Abb. 17

1960) und in Kalbsleber (GRISOLLA und CARDOSO 1957) nachgewiesen. In Clostridium uracilicum ist das Enzym dagegen spezifisch für $NADH_2$ (CAMPBELL 1957 b).

Die Dihydrouracil-Hydrase katalysiert die hydrolytische Spaltung des Dihydrouracils zum 3-Ureidopropionat. Das Enzym wurde von WALLACH und GRISOLLA (1957) aus Kalbsleber-Vollhomogonat und von CAMPBELL (1958) aus Clostridium uracilicum angereichert und näher charakterisiert. Die spezifische Enzymaktivität wurde dabei durch die colorimetrische Bestimmung des Reaktionsproduktes 3-Ureidopropionat nach ARCHIBALD (1944) gemessen. Da bei der enzymatischen Spaltung des hydrierten Pyrimidinringes eine Säure entsteht, sollte die spezifische Aktivität des Enzyms auch direkt titrimetrisch bestimmt werden können. Dafür wurde die in Abb. 25 dargestellte Titrationseinheit verwendet. Titriert wurde mit kohlendioxidfreier NaOH, die zum Druckausgleich über eine Kohlendioxid-Absorptionseinheit mit der Außenluft verbunden war. Der Titer der Lauge wurde täglich vor den enzymatischen Bestimmungen mit 0,01 N HCl bestimmt. Die Kinetik solch eines Testes mit einem zellfreien Extrakt von H. facilis gibt Abb. 17 wieder. Unter diesen Bedingungen war in einem Bereich von 0,15 bis 0,45 mg Protein je 3 ml Ansatz die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzymreaktion proportional der eingesetzten Rohextraktmenge (Abb. 18).

c. Induktive Bildung der Enzyme

Nach Ausarbeitung geeigneter Methoden zur Messung der ersten drei Enzyme der Cytosinabbaukette, wurde der Einfluß verschiedener N-Quellen auf die Bildung dieser Enzyme näher untersucht. H. facilis wurde mit Fructose als C- und Energiequelle und mit den in Tab. 11 aufgeführten N-Quellen angezogen und aus der exponentiellen Phase geerntet. Die N-Mangelzellen wurden nach Wachstum mit einer begrenzenden Menge Ammoniumchlorid 12 Stunden nach Eintritt in die stationäre Phase geerntet. Als Indikator für die Konzentration an freien Ammonium-Ionen in der Zelle

Tab. 11: Spezifische Aktivitäten der Urease, der Cytosin-Desaminase und der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase nach Anzucht mit verschiedenen N-Quellen

| N-Quelle | Spez. Enzymaktivitäten (µmole/min/g) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Urease | CY-DA | Dihydropyrimidin-Dehydrogenase Substrate: | | |
| | | | DHU | Dihydrothymin | Dihydroorotat |
| $NH_4Cl$ | 8 | 10 | 0,0 | 0,0 | - |
| N-Mangel | 244 | 9 | 1 | 1 | - |
| Cytosin | 144 | 12 | 4,2 | 2,6 | - |
| Uracil | 176 | 18 | 14 | 8,2 | 0,0 |
| Thymin | 101 | 16 | 9,5 | 5,5 | - |
| Orotat | 152 | 23 | 4,3 | 2,3 | 0,0 |

Hydrogenomonas facilis wurde in fructosehaltigem Nährmedium (5 mg Fructose/ml) mit verschiedenen N-Quellen (10 µmole je ml) herangezogen und bei einer Extinktion (E = 550 nm) von 0,95 bis 1,5 geerntet. Die unter N-Mangel herangezogenen Zellen wurden 12 Stunden nach Eintritt in die stationäre Wachstumsphase bei einer Extinktion von 1,8 geerntet. Bis zur Herstellung zellfreier Extrakte wurden die Zellen bei -15°C gelagert. Die spezifischen Aktivitäten sind angegeben in µmole gebildetes $NH_4^+$/min/g Protein (Urease und CY-DA) und in µmole oxidiertes $NADPH_2$/min/g Protein (Dihydropyrimidin-DH).

wurde in allen Ansätzen die Ureaseaktivität bestimmt. Die in Tab. 11 zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß beim Wachstum mit den angebotenen Pyrimidinderivaten - Cytosin, Uracil, Thymin oder Orotsäure - der Gehalt an freien Ammonium-Ionen oder den daraus entstandenen Aminosäuren in der Zelle nicht ausreichte, die Ureasebildung voll zu reprimieren. In N-Mangelzellen hatte die Urease eine 30fach höhere Aktivität als in Ammoniumchlorid-Zellen (244 E/g zu 8 E/g). Aber auch in Zellen, die mit Uracil als N-Quelle gewachsen waren, fand eine derepressive Ureasebildung statt (176 E/g).

Der Befund, daß die Thymin- und die Dihydrouracil-Oxidation induzierbar sind (Abb. 16 und 17), wurde durch Messungen der Uracil und der Thymin abbauenden Enzyme in zellfreien Extrakten von M. facilis bestätigt. Zellen, die mit Ammoniumchlorid angezogen wurden, hatten keine meßbare Dihydrothymin- oder Dihydrouracil-Dehydrogenase-Aktivität (Tab. 11) und die spezifische Aktivität der Dihydrouracil- und der Dihydrothymin-Hydrase betrug 3 E/g (Tab. 11). Allerdings hatte die Cytosin-Desaminase eine relativ hohe spezifische Aktivität (10 E/g). In Abwesenheit einer N-Quelle wurden diese Enzyme nicht gebildet. In Uracilzellen waren [illegible] nicht nur die Dihydrouracil-Dehydrogenase (389 E/g) und die Dihydrouracil-Hydrase (389 E/g), sondern auch die Dihydrothymin-Dehydrogenase (8,2 E/g) und die Dihydrothymin-Hydrase (126 E/g) induziert. Eine Dihydroorotat-Dehydrogenase oder eine Hydrase konnten nicht nachgewiesen werden. Auch in Zellen, die mit Thymin als N-Quelle angezogen worden waren, wurde neben der Dihydrothymin-Dehydrogenase (5,4 E/g) und der Dihydrothymin-Hydrase (57 E/g) ebenfalls die Dihydrouracil-Dehydrogenase (9,5 E/g) und die Dihydrouracil-Hydrase (157 E/g) induziert.

Tab. 12: Induktive Bildung der Dihydropyrimidin-Hydrase

| N-Quelle | Spez. Aktivität der Dihydropyrimidin-Hydrase | | |
|---|---|---|---|
| | Substrate: | | |
| | DHU | Dihydrothymin | Dihydroorotat |
| $NH_4Cl$ | 3 | 3 | - |
| N-Mangel | 3 | 4 | - |
| Cytosin | 81 | 30 | - |
| Uracil | 389 | 126 | 0,0 |
| Thymin | 157 | 57 | - |
| Orotat | 201 | 58 | 0,0 |

Die spezifischen Enzymaktivitäten sind angegeben in µmole gebildete Säure/min/g Protein. Methoden wie in Tab. 11

Mit Orotsäure gewachsene Zellen hatten eine deutlich höhere Aktivität der Dihydrothymin-Dehydrogenase (2,3 E/g), der Dihydrouracil-Dehydrogenase (4,3 E/g), der Dihydrothymin-Hydrase (58 E/g) und der Dihydrouracil-Hydrase (201 E/g) als Zellen, die mit Ammoniumchlorid angezogen worden waren. Dagegen wurde auch in diesen Zellen unter den Meßbedingungen zur Bestimmung der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase und der Dihydropyrimidin-Hydrase mit Orotat bzw. Dihydroorotat als Substrat keine Aktivität gefunden.

Die höchsten Aktivitäten der Cytosin-Desaminase hatten Zellen, die mit Orotat (23 E/g), mit Uracil (18 E/g) oder mit Thymin (16 E/g) gewachsen waren. Mit Cytosin als N-Quelle wurden nur schwach erhöhte Aktivitäten (12 E/g) gegenüber Ammoniumchlorid- und N-Mangelzellen beobachtet (10 bzw. 9 E/g).

Diese in Tab. 11 und 12 zusammengestellten Ergebnisse lassen folgendes erkennen: 1. Die ersten drei Enzyme des Cytosinabbaues werden induktiv gebildet. Dabei hat die Cytosin-Desaminase schon in Abwesenheit äußerer Pyrimidine eine relativ hohe spezifische Aktivität. Die Tatsache, daß nicht mit Cytosin sondern mit Orotsäure, Uracil oder Thymin die höchsten Aktivitäten gemessen wurden, deutet auf die Möglichkeit hin, daß nicht Cytosin, sondern ein Folgeprodukt des Cytosinabbaues der eigentliche Induktor der Enzymbildung ist. 2. Die Uracil und die Thymin verwertenden Enzyme werden immer zusammen induziert. 3. Orotsäure wird offenbar über Uracil abgebaut und nicht wie in Clostridium oroticum über Dihydroorotat. 4. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Uracilabbaues ist die Reduktion des Uracils zum Dihydrouracil. In Zellen, die mit Uracil gewachsen sind, beträgt das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der Cytosin-Desaminase zur Dihydrouracil-Dehydrogenase zur Dihydrouracil-Hydrase 1,2 : 1 : 27. 5. Das Angebot an verwertbarem Stickstoff ist beim Wachstum mit Pyrimidinderivaten so gering, daß die Urease dereprimiert wird.

4. Defektmutanten von H. facilis

Die Klärung der Fragen, ob Uracil und Thymin von zwei oder einer einzigen Enzymkette verwertet werden, ob Orotsäure über Uracil abgebaut wird und die Frage nach dem Induktor bzw. den Induktoren der Uracil abbauenden Enzyme sollte am klarsten mit Hilfe von Mutanten zu beantworten sein, die bestimmte Enzyme des Cytosinabbaues nicht mehr zu bilden vermögen. Im Folgenden wird die Anreicherung, Isolierung und Charakterisierung dieser Mutanten beschrieben.

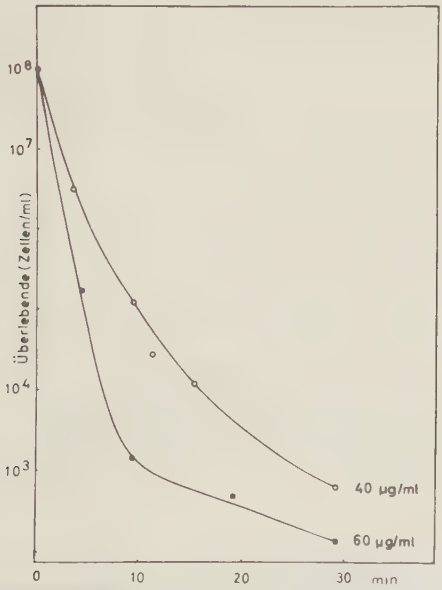



Abb. 19: Inaktivierung von Hydrogenomonas facilis während der Inkubation mit verschiedenen Mengen an NMG

Zu je 100 ml einer in der exponentiellen Phase wachsenden Kultur von H. facilis (ca. 10 Zellen/ml) wurden a) 6 ml und b) 10 ml NMG-Lösung (20mg/30ml) zupipettiert, so daß die Endkonzentration des mutagenen Agenz a) 40 µg/ml und b) 60 µg/ml betrug. Das Mutationsgemisch wurde unter Schütteln bei 28°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen, mit Salzlösung verdünnt und ausplattiert.

a. Mutationsauslösung und Anreicherung

Als mutationsauslösendes Agenz wurde 1-Nitroso-3-nitro-1methyl-guanidin (NMG) verwendet. Bei einer Konzentration von 60 µg NMG/ ml waren von $10^8$ mit Ammoniumchlorid wachsenden Zellen je ml Nährlösung bereits nach 10 Minuten 99,999 % abgetötet (Abb. 19). Bei der Inkubation der wachsenden Zellen mit 40 µg NMG/ ml waren nach 10 Minuten noch 0,1 % Überlebende vorhanden.

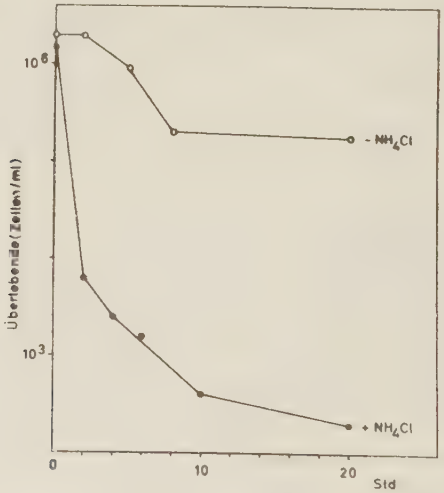



Abb. 20: Abnahme der Lebendzellzahl von Hydrogenomonas facilis in Gegenwart und in Abwesenheit von $NH_4Cl$ während der Inkubation mit 300 I. E. Penicillin je ml

Zellen von H. facilis wurden mit 300 I. E. Pc. je ml Suspension inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und die Zahl der Überlebenden in der wachsenden (+ $NH_4Cl$) und in der nichtwachsenden (- $NH_4Cl$) Kultur bestimmt. Versuchsbedingungen wie in Tab. 13.

DE CICCO und UMBREIT (1964) isolierten mit Hilfe der Penicillintechnik nach LEDERBERG und ZINDER (1948) und DAVIES (1948) auxotrophe Mutanten von H. facilis. Die weiteren Untersuchungen dienten der Ermittlung einer optimalen Penicillinkonzentration und einer günstigen Einwirkungsdauer des Penicillins. Da für die Voruntersuchungen noch keine Mutanten von H. facilis zur Verfügung standen, wurde als Modell die Einwirkung des Penicillins auf wachsende und ruhende Zellen miteinander verglichen und so ein theoretischer Anreicherungsfaktor ermittelt (REH 1967).

Aus den in Tab. 13 zusammengestellten Werten geht hervor, daß Penicillin auch ruhende Zellen abtötet. 100 I. E. Penicillin je ml inaktivierten nach 3 Stunden 20 %, 300 I. E. Penicillin je ml 40 % der ruhenden Zellen, während von den wachsenden Zellen in der gleichen Zeit bereits 97,5 % (100 I. E. Penicillin/ml) bzw. 99,4 % (300 I. E. Penicillin/ml) abgetötet worden waren. Bei höheren Penicillinkonzentrationen wird auch die Inaktivierung der nichtwachsenden Zellen beträchtlich erhöht. So werden durch 1000 I. E. Penicillin je ml bereits nach 3 Stunden 75 %, durch 2500 I. E. Penicillin/ml 90 % und durch 4000 I. E. Penicillin/ml 96,5 % der ruhenden Zellen abgetötet.

Abb. 20 stellt die Abnahme der Lebendzellzahl während der Einwirkung von 300 I. E. Penicillin/ml auf eine ruhende und auf eine mit Ammoniumchlorid als N-Quelle wachsende Kultur dar. Nach 20stündiger Inkubation überlebten von den ruhenden Zellen noch 10 %, während von den wachsenden Zellen lediglich 0,01 % noch zur Koloniebildung fähig waren. Das entspricht einem theoretischen Anreicherungsfaktor von 1000.

Tab. 13: Anzahl der überlebenden Zellen nach 3stündiger Behandlung mit verschiedenen Penicillinkonzentrationen

| Penicillinkonzentration I. E./ml Suspension | Überlebende (%) ohne $NH_4Cl$ | Überlebende (%) mit $NH_4Cl$ |
|---|---|---|
| 100 | 80 | 2,5 |
| 300 | 60 | 0,6 |
| 1000 | 25 | 0,5 |
| 2500 | 10 | 0,06 |
| 4000 | 3,5 | 0,01 |

1) Wachsende Zellen: Zellen von H. facilis wurden bis zu einer Zelldichte von 1 - $5 \cdot 10^8$ Zellen/ml herangezogen und auf 1x $10^8$ Zellen/ml verdünnt. Mit 0,5 ml dieser Suspension wurden 8,5 ml FM beimpft, drei Stunden bei 28°C geschüttelt und dann mit 1 ml Penicillinlösung versetzt. Nach drei Stunden wurde die Abtötung durch Verdünnen in Salzlösung und Ausplattieren auf FM-Agar abgebrochen. Die nach 4 Tagen ausgezählten Koloniezahlen sind in Prozenten der penicillinfreien Kontrolle angegeben.

2) Ruhende Zellen: Zellen von H. facilis wurden aus einer Vorkultur geerntet, gewaschen und zu 1x $10^8$ Zellen/ml in N-freier Salzlösung resuspendiert. 0,5 ml dieser Suspension wurden in 8,5 ml N-freie FM-Lösung gebracht, über Nacht geschüttelt und dann weiter wie in 1) beschrieben behandelt.

b) Verwertung von Cytosin und Ausscheidungsprodukte

Mit Hilfe der oben ausgearbeiteten Methode wurden aus 9 unabhängigen Anreicherungskulturen 35 Mutanten isoliert, die sich im Spektrum der verwertbaren N-Quellen vom Wildtyp H. facilis unterschieden. Aus 4 Ansätzen konnten 27 Stämme isoliert werden, die nicht mehr mit Uracil, wohl aber mit Cytosin, Dihydrouracil, ß-Alanin und Ammoniumchlorid als N-Quelle wuchsen. Von diesen Mutanten wurde der Stamm $Py^{-}31$ zur näheren Charakterisierung ausgewählt. Ein Mutantenstamm vermochte Cytosin, ß-Alanin und Ammoniumchlorid aber nicht Dihydrouracil als N-Quelle zu nutzen (Stamm $Py^{-}6$). Daneben wurden aus drei Anreicherungskulturen 4 Stämme isoliert, die noch mit Ammoniumchlorid wuchsen, aber die Intermediärprodukte des Cytosinabbaues (Cytosin, Uracil, Dihydrouracil und ß-Alanin) nicht mehr verwerten konnten. Diese Mutanten wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

H. facilis bildet in einer Nährlösung, die Stickstoff in begrenzender Menge enthält, etwa 60 g Protein je mol verwertbarer N-Atome (Tab. 14). Der Proteingehalt gibt damit an, ob und in welchem Umfang eine N-Quelle von der Zelle genutzt wird. Entsprechende Untersuchungen an den Mutanten von H. facilis ergaben, daß die Stämme $Py^{-}31$ und $Py^{-}6$ ca. 60 g Protein je mol Ammoniumchlorid bildeten. Mit Cytosin als N-Quelle, das 3 N-Atome je Molekül enthält, wurde lediglich vom Wildstamm H. facilis die dreifache Menge an Protein (168 g Protein/mol Cytosin) synthetisiert. Die Mutanten $Py^{-}31$ und $Py^{-}6$ verwerteten nur ein N-Atom je mol Cytosin (64 bzw. 79 g Protein/mol Cytosin). Beim Wachstum von $Py^{-}31$ und $Py^{-}6$ mit Cytosin muß demnach ein Intermediärprodukt in der Zelle oder im Medium angehäuft werden, das noch 2 N-Atome je Molekül enthält.

Die Identifizierung der nicht verwertbaren Intermediärprodukte erfolgte papierchromatographisch. Aliquote Teile der zellfreien Überstände wurden nach Wachstum mit Cytosin absteigend chromatographiert. Als Vergleichssubstanzen dienten Uracil, Dihydrouracil,

Cytosin und 3-Ureidopropionat. Das Ergebnis dieser Untersuchungen gibt Abb. 21 wieder. In allen Ansätzen war chromatographisch kein Cytosin mehr nachweisbar. Im Überstand der Py⁻31-Zellen konnte als Ausscheidungsprodukt Uracil und im Überstand der Py⁻6 Zellen Dihydrouracil identifiziert werden. In der Nährlösung der H. facilis-Kultur befanden sich keine Anhäufungsprodukte.

Die vorliegenden Untersuchungen hatten gezeigt, daß der Defekt der Mutantenstämme nicht auf dem Unvermögen beruht, Uracil bzw. Dihydrouracil in die Zelle zu transportieren; Py⁻31 vermag Uracil und Py⁻6 Dihydrouracil nicht abzubauen, auch wenn die Substrate beim Wachstum mit Cytosin in der Zelle vorliegen.

Tab. 14: Unterschiedliche Verwertung von Cytosin als N-Quelle für das Wachstum von H. facilis, Py⁻31 und Py⁻6

| Substrat | Organismus | Proteinbildung | | |
|---|---|---|---|---|
| | | g Protein/mol Substrat | g Protein/ mol verwert. Stickstoffs | Anzahl verwerteter N-Atome |
| - | Py⁻31 | 2 | 2 | 0 |
| | Py⁻6 | 2 | 2 | 0 |
| | H. facilis | 2 | 2 | 0 |
| $NH_4Cl$ | Py⁻31 | 59 | 59 | 1 |
| | Py⁻6 | 58 | 58 | 1 |
| | H. facilis | 59 | 59 | 1 |
| Cytosin | Py⁻31 | 79 | 79 | 1 |
| | Py⁻6 | 64 | 64 | 1 |
| | H. facilis | 168 | 56 | 3 |

Zellen von Hydrogenomonas facilis, Py⁻31 und Py⁻6 wurden in 10 ml fructosehaltiger Nährlösung mit begrenzenden Mengen an $NH_4Cl$ bzw. Cytosin herangezogen, nach 5 Tagen Wachstum durch Zusatz von TCE abgetötet und abzentrifugiert. Anschließend erfolgte die Proteinbestimmung im Zentrifugationssediment.

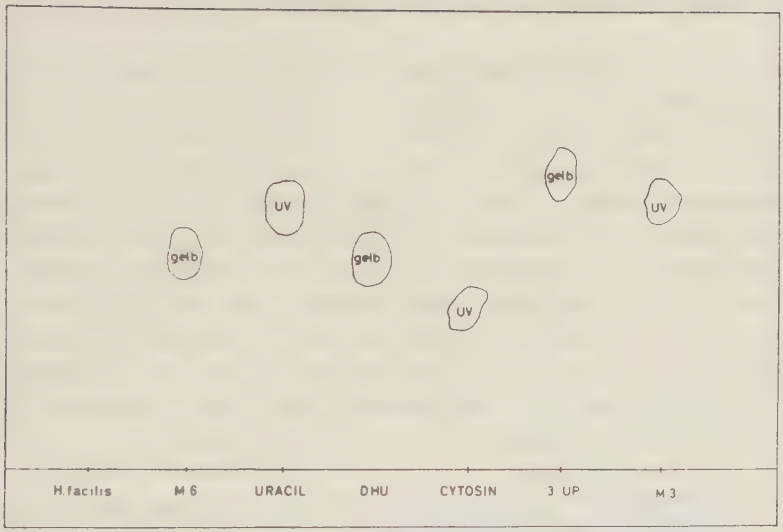



Abb. 21: Papierchromatographische Identifizierung der Ausscheidungsprodukte von H. facilis-Mutanten nach Wachstum mit Cytosin

H. facilis, $Py^{-}31$ (M 3) und $Py^{-}6$ (M 6) wurden mit Cytosin (5 µmole/ml) als N-Quelle angezogen und nach Eintritt in die stationäre Phase abzentrifugiert. 10 µl der zellfreien Überstände und Vergleichslösungen von Dihydrouracil (DHU), Cytosin, Uracil und 3-Ureidopropionat (3-UP) wurden absteigend chromatographiert.

Zeichenerklärung: gelb = gelbe Flecken mit p-DABA-Reagenz nach der Hydrolyse mit 0,5 N NaOH

UV = dunkle Flecken unter einer UV-Lampe (260 nm)

Papier: S & S 2043 b, Mgl

Lösungsmittel: wassergesättigtes n-Butanol

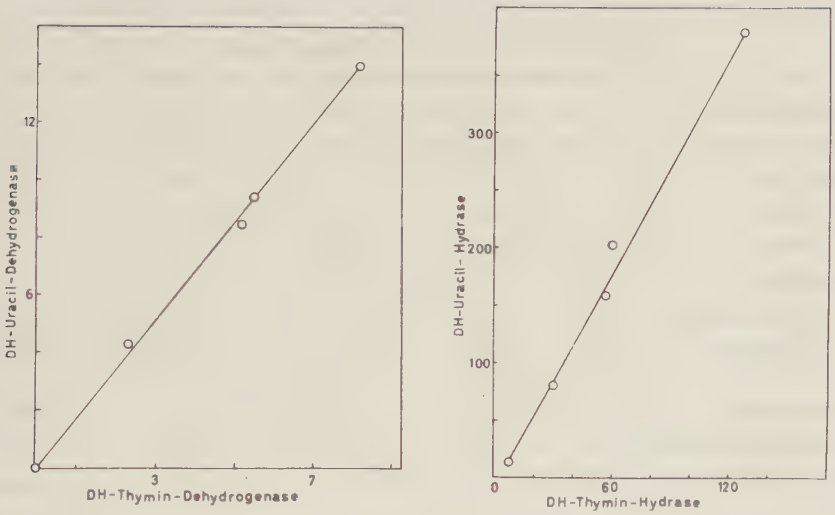
Nachweisreagenzien: Siehe Abb. 14a

## 5. Abbau von Uracil, Thymin und Orotsäure durch den Wildstamm und durch Defektmutanten von H. facilis

In dem einzigen Bakteriensystem, in dem der reduktive Abbau des Uracils bisher näher untersucht wurde (Clostridium uracilicum) sind die Dihydrouracil-Dehydrogenase, die Dihydrouracil-Hydrase und die 3-Ureidopropionase streng spezifisch. Die Dihydrouracil-Dehydrogenase reagiert nur mit Uracil, aber nicht mit Thymin oder Orotsäure. Die Dihydrouracil-Hydrase katalysiert lediglich die Hydrolyse des Dihydrouracils, aber nicht die des Dihydrothymins oder die des Hydantoins (CAMPBELL 1957 b, 1958, 1960). An Hand von wachstumsphysiologischen und enzymatischen Untersuchungen bei H. facilis und den Mutanten $Py^-31$ und $Py^-6$ wurde geprüft, ob für den Abbau von Thymin, Uracil und Orotsäure eine einzige oder mehrere Enzymketten verantwortlich sind.

Wie aus den in Tab. 11 zusammengefaßten Ergebnissen hervorgeht, wurde die Dihydrouracil-Dehydrogenase und die Dihydrothymin-Dehydrogenase immer zusammen induziert. Trägt man die spezifischen Aktivitäten dieser Enzyme gegen einander auf, so ergibt sich das in Abb. 22 dargestellte Bild. Das Verhältnis der Dihydrouracil-Dehydrogenase zur Dihydrothymin-Dehydrogenase ist unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen immer gleich (Abb. 22a). Dieser Befund könnte einerseits damit erklärt werden, daß es sich um zwei Enzyme handelt, die koordiniert induziert werden. Andrerseits könnte die Reduktion des Thymins und des Uracils durch dieselbe Dehydrogenase erfolgen. Ähnliche Verhältnisse ergaben sich bei der Untersuchung der Dihydrouracil- und der Dihydrothyminspaltung zum 3-Ureidopropionat bzw. zur 3-Ureidoisobuttersäure. Auch in diesem Fall wurde die Dihydrouracil-Hydrase und die Dihydrothymin-Hydrase nach Anzucht mit verschiedenen Substraten (Tab. 12) immer im gleichen Verhältnis zueinander synthetisiert. Abb. 22b gibt diese lineare Beziehung graphisch wieder.

Von den in Tab. 15 aufgeführten Substraten - Ammoniumchlorid, Uracil, Dihydrouracil, Thymin, Dihydrothymin, Cytosin, 3-Ureido-




a b

Abb. 22: Verhältnisse der spezifischen Aktivitäten der Dihydrouracil- zur Dihydrothymin-Dehydrogenase (a) und der Dihydrouracil- zur Dihydrothymin-Hydrase (b) nach Anzucht mit verschiedenen Substraten

Versuchsbedingungen wie in Tab. 12 und 13

propionat, Orotsäure und Dihydroorotat konnten H. facilis alle als N-Quelle nutzen. Mit Orotsäure wuchs der Organismus wesentlich langsamer als mit den anderen Substraten. 3-Ureidopropionat und Cytosin wurden ebenfalls von den Stämmen $Py^{-}31$ und $Py^{-}6$ verwertet. Im Gegensatz zu $Py^{-}6$ wuchs $Py^{-}31$ noch mit Dihydrothymin und mit Dihydrouracil, aber ebenso wie $Py^{-}6$ nicht mehr mit Uracil, Orotsäure oder Thymin. Das heißt also, daß Mutanten, die Uracil nicht mehr als N-Quelle zu nutzen vermögen, auch mit Thymin und Orotsäure nicht wachsen, und daß Mutanten, die die Fähigkeit verloren haben, Dihydrouracil zu verwerten, auch Dihydrothymin als N-Quelle nicht mehr nutzen können. Beide Mutantenstämme konnten jedoch wie der Wildstamm H. facilis Dihydroorotat abbauen.

Tab. 15: Substratverwertung durch H. facilis, Py⁻31 und Py⁻6

| N-Quelle | Organismus | | |
|---|---|---|---|
| | H. facilis | Py⁻31 | Py⁻6 |
| $NH_4Cl$ | ++ | ++ | ++ |
| Uracil | ++ | - | - |
| DHU | ++ | (+) | - |
| Thymin | ++ | - | - |
| Dihydrothymin | ++ | + | - |
| Cytosin | ++ | ++ | ++ |
| 3-UP | ++ | + | ++ |
| Orotat | (+) | - | - |
| Dihydroorotat | + | + | + |

Alle Ansätze enthielten außer den genannten N-Quellen (je 10 µ-mole/ml NL) noch 5 mg Fructose je ml Nährlösung als C- und Energiequelle.
Methoden und Zeichenerklärung siehe Tab. 5

Der Beweis, daß Orotsäure über Uracil abgebaut wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit nur indirekt erbracht werden. Der reduktive Abbauweg über Dihydroorotat, wie er in Clostridium oroticum nachgewiesen wurde (LIEBERMANN und KORNBERG 1953), konnte für H. facilis ausgeschlossen werden, da nach Wachstum mit Orotsäure weder die Dihydroorotat-Dehydrogenase noch die Dihydroorotat-Hydrase gebildet wurde (Tab. 11 und 12). Ein anderer Abbauweg führt über Uracil. Diese Umwandlung der Orotsäure in Uracil könnte einmal Orotidin-5'-phosphat und Uridin-5'-phosphat als Intermediärprodukte einschließen (LIEBERMANN et al. 1955) oder die Bildung des Uracils könnte durch direkte Decarboxilierung der Orotsäure erfolgen (KUHLHANEK et al. 1965). Für Uracil als Intermediärprodukt beim Orotsäureabbau durch H. facilis sprechen die Befunde, daß eine Mutante, die Uracil nicht mehr verwerten kann, auch mit Orotsäure nicht mehr wächst, und daß beim Wachstum mit Orotsäure die Uracil verwertenden Enzyme induziert werden.

Die vorliegenden Ergebnisse an intakten Zellen wurden durch enzymatische Messungen mit zellfreien Extrakten bestätigt (Tab. 16). Zellen von H. facilis, Py$^-$31 und Py$^-$6 wurden mit Cytosin angezogen und aus der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Im Überstand der Py$^-$31-Zellen konnte wieder Uracil und im Überstand der Py$^-$6-Zellen Dihydrouracil als Ausscheidungsprodukt nachgewiesen werden. Extrakte aus Py$^-$31-Zellen vermochten in Gegenwart von $NADPH_2$ weder Uracil noch Thymin zu den entsprechenden Dihydroverbindungen zu reduzieren. Ebenso konnte in Extrakten des Stammes Py$^-$6 weder eine Dihydrouracil- noch eine Dihydrothymin-Hydrase-Aktivität nachgewiesen werden. In beiden Mutantenstämmen fand sich jedoch eine relativ hohe Cytosin-Desaminase-Aktivität (25 bzw. 28 E/g). Dihydrouracil bzw. Dihydrothymin-Desoxyribosylase wurde nur im Wildstamm H. facilis (7,1 bzw. 1,1 E/g) und in der Mutante Py$^-$6 (28 bzw. 29 E/g) gebildet.

Tab. 16: Spezifische Aktivitäten der Cytosin abbauenden Enzyme von H. facilis, Py$^-$31 und Py$^-$6 nach Wachstum mit Cytosin

| Spez. Enzymaktivität | Organismus | | |
|---|---|---|---|
| | H. facilis | Py$^-$31 | Py$^-$6 |
| CY-DA | 17,4 | 25,1 | 28,0 |
| DHU-DH | 9,3 | 0,0 | 20,0 |
| Dihydrothymin-DH | 5,8 | 0,0 | 13,3 |
| DHU-Hydrase | 144 | 1 | 0,0 |
| Dihydrothymin-Hydrase | 46 | 1 | 0,0 |

Hydrogenomonas facilis, Py$^-$31 und Py$^-$6 wurden in einem Phosphatsalzhaltigen Medium mit 10 µmole Cytosin/ml in 100 ml NL angezogen und bei einer Extinktion (578 nm) von 1,7 (Py$^-$31), 1,4 (Py$^-$6) bzw. 3,04 (H. facilis) geerntet. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme sind angegeben in µmole freigesetztes $NH_3$/min/g Protein (CY-DA), in µmole gebildete Säure/min/g Protein (Dihydrouracil-Dihydro-Cytosin) und in µmole oxidierte NADH/min/g Protein (Dihydropyrimidin-DH).

Die vorliegenden Befunde zeigen, daß Uracil und Thymin tatsächlich durch eine einzige Enzymkette abgebaut werden, deren Bildung durch Uracil und Thymin oder deren Nachfolgeprodukte induziert werden kann: 1. Die Enzyme der Uracil- und der Thyminverwertung werden immer im gleichen Verhältnis zueinander synthetisiert. 2. Bei einer Mutation, die die Bildung der Uracil abbauenden Enzyme verhindert, wird ebenfalls die Thyminverwertung blockiert.

## C. DISKUSSION

### 1. Harnstoffverwertung

In Hydrogenomonas unterliegt die Ureasebildung einer starken Repression, die nicht nur durch Ammonium-Ionen, sondern in noch stärker ausgeprägtem Maße durch komplexe N-haltige Nährmedien wie Trypton, Hefeextrakt und Nutrient Broth ausgelöst wird. Unabhängig von der Art der anfänglich gebotenen N-Quelle wurden die höchsten Enzymaktivitäten in solchen Zellen gemessen, die nach Verbrauch des Stickstoffs in die stationäre Phase eingetreten waren. Harnstoff hatte in Gegenwart anderer N-Verbindungen keinen induzierenden Einfluß auf die Ureasebildung. Das gilt nicht nur für Hydrogenomonas H16, sondern auch für Micrococcus denitrificans, Pseudomonas fluorescens und Sarcina ureae. Dagegen ergaben die Untersuchungen bei Proteus rettgeri einen induzierenden Einfluß von Harnstoff auch in Gegenwart von Pepton (MAGANA-PLAZA und RUIZ-HERRERA 1967). In Gegenwart von Ammoniak wird bei diesem Organismus die Ureasebildung nicht nur reprimiert, sondern schon gebildete Urease wird durch die Ammonium-Ionen auch kompetitiv gehemmt. Bei Hydrogenomonas H16 ergaben sich keine Anhaltspunkte für einen derartigen Einfluß von Ammonium-Ionen auf die Ureaseaktivität.

Wird Zellen von Hydrogenomonas H16 Harnstoff als alleinige N-Quelle geboten, so wird zwar Urease gebildet, jedoch nur mittlere spezifische Enzymaktivität erreicht. Nähere Untersuchungen hatten ergeben, daß der Ureasespiegel während des Wachstums mit Harnstoff als N-Quelle charakteristischen Schwankungen unterliegt, die offensichtlich durch das freigesetzte Ammoniak und die dadurch ausgelöste Enzymrepression zustande kommen (KÖNIG und SCHLEGEL 1967). Demzufolge scheinen allein Repression und Derepression, das heißt An- und Abwesenheit einer N-Quelle die Ureasebildung in Hydrogenomonas H16 zu steuern. Aus den in Tab. 3 aufgeführten Ergebnissen ist ersichtlich, daß die Ureasebildung nicht bei allen untersuchten Stämmen der Repression unterliegt.

Die Stämme mit konstitutiver Ureasebildung weisen unabhängig von der Art der Anzucht stets einen hohen Gehalt an diesem Enzym auf.

Die Unterscheidung in konstitutive und reprimierbare Ureasebildner konnte nicht nur im aufwendigen enzymatischen Test, sondern auch mit Hilfe einfacher Plattentests gemacht werden. Nach Inkubation auf dem Ureasetestmedium nach CHRISTENSEN(1946) erwiesen sich alle diejenigen Stämme als eindeutig urease-positiv, die das Enzym konstitutiv bilden. Für die Gruppe derjenigen Bakterienstämme, bei denen die Ureasebildung einer Regulation unterliegt, konnte mit diesem Prüfungsverfahren die Ureasebildung nicht eindeutig nachgewiesen werden. Für Pseudomonaden wurde durch STEWART (1965) ein Verfahren beschrieben, welches trotz der Repression durch Ammonium-Ionen den Nachweis der Urease gestattet. Die Zellen wurden dabei in einem flüssigen Glucosemedium inkubiert, welches eine komplexe N-Quelle in nur wachstumsbegrenzender Menge enthält. Nach 40stündigem Wachstum wird Harnstoff zugesetzt und die Veränderung des Indikatorfarbstoffs registriert.Diese Technik erwies sich bei einer großen Anzahl von Pseudomonaden als zuverlässig. Bei den vorliegenden Untersuchungen konnten in ähnlicher Weise alle Urease bildenden Stämme einschließlich der reprimierbaren als urease-positiv erkannt werden. Um zu entscheiden, ob ein Bakterienstamm Urease zu bilden vermag, ist es daher zweckmäßig, N-Mangelzellen zu untersuchen. Für ein weites Spektrum von Bakterienstämmen sind die hier angewendeten Testnährböden A und B, die nur ein definiertes Minimalmedium enthalten, nicht geeignet. Ein universell anwendbarer Nährboden zum Ureasenachweis sollte daher wie bei STEWART (1965), eine komplexe N-Quelle in wachstumsbegrenzender Menge enthalten.

Es erhebt sich die Frage, ob nicht auch die Reprimierbarkeit der Enzymbildung ermittelt und zur Diagnostizierung von Bakterienstämmen herangezogen werden kann. Bei den wenigen von uns untersuchten Stämmen konnte auf Grund enzymatischer Untersuchungen zwischen konstitutiver und reprimierbarer Ureasebildung eindeutig unterschieden werden. Die während des Wachstums unter N-

Mangel gleichbleibend hohe Enzymaktivität in Proteus vulgaris und die starke Zunahme in Pseudomonas aeruginosa repräsentieren das Verhalten beider Gruppen. Die Reaktion auf den Agarnährböden stimmte mit den Ergebnissen der enzymatischen Untersuchungen überein. Folglich läßt sich in einem komplexen Medium die Repression der Enzymbildung erkennen. Der Ureasetest nach STEWART (1965) wäre dazu lediglich insofern zu modifizieren, als die Zellen in einem Parallelansatz in einer mit einem Überschuß von Ammoniumsalz ergänzten Nährlösung herangezogen werden. Ureasekonstitutive Stämme beantworten dann den Harnstoffzusatz mit rascher Alkalisierung, reprimierbare Stämme beantworten ihn nicht oder mit wesentlich langsamerer Alkalibildung.

Eine vierte Gruppe von Bakterien, die zwar Urease synthetisieren, aber den Harnstoff nicht in die Zelle transportieren kann, wurde nicht gefunden. Es konnten aber derartige Mutanten von Hydrogenomonas H16 isoliert werden. Diese Mutanten bildeten wie der Wildstamm unter N-Mangelbedingungen Urease. Neben Harnstoff vermochten alle Mutanten auch ß-Alanin, Cytosin und 3-Ureidopropionat im Gegensatz zum Wildstamm nicht mehr als N-Quelle zu nutzen. Möglicherweise wird der Transport des Harnstoffs in das Zellinnere durch eine Permease bewirkt, die auch für den Transport anderer N-haltiger Verbindungen verantwortlich ist. Die Untersuchungen an Proteus rettgeri machen deutlich, daß die Harnstoffverwertung nicht nur von der Ureasebildung und von der Ureaseaktivität abhängig ist (MAGANA-PLAZA und RUIZ-HERRERA 1967). Offenbar ist bei diesem Stamm der Transport des Harnstoffs in die Zelle nicht nur der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Harnstoffverwertung, sondern die aktive Aufnahme wird überdies noch durch Ammonium-Ionen gehemmt.

## 2. Glutamat- und Ammoniakverwertung

Die Untersuchungen an Hydrogenomonas H16 hatten ergeben, daß beim Wachstum unter autotrophen und heterotrophen Bedingungen zwei Glutamat-Dehydrogenasen gebildet werden. Da in der lebenden Zelle NAD vorwiegend in der oxidierten und NADP vorwiegend in der reduzierten Form vorliegt, war zu vermuten, daß die NAD-GluDH dem Abbau der Glutaminsäure mit NAD zu α-Ketoglutarsäure und Ammoniak dient, während die NADP-GluDH zur Biosynthese von Glutaminsäure aus $NADPH_2$ aus α-Ketoglutarsäure und Ammoniak benötigt wird. Für Neurospora, Piricularia und Hefe liegen Befunde vor, wonach das NAD-abhängige Enzym tatsächlich vorwiegend katabolische und das NADP-abhängige Enzym anabolische Funktion hat. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die NAD-GluDH-Bildung in Hydrogenomonas H16 von äußeren N-Quellen abhängt. Unter N-Mangel setzte wie bei der Urease eine derepressive Synthese des Enzyms ein. Dieser Befund weist darauf hin, daß auch in H16 die NAD-GluDH für die Lieferung von Stickstoff (Ammoniak aus Glutamat) verantwortlich ist. Die Frage, ob Ammoniak, Glutamat oder ein Folgeprodukt des Glutamats (Glutamin) der eigentliche Corepressor ist, kann nach den bisher vorliegenden Experimenten nicht entschieden werden. In Hefe scheint Ammoniak die reprimierende Substanz zu sein (HIERHOLZER und HOLZER 1963). Bei Hydrogenomonas H16 findet aber auch in Gegenwart von Ammonium-Ionen eine schwache Derepression der Enzymbildung statt. Außerdem wurde in einem ammoniakhaltigen Medium im Vergleich zu einem Medium mit Glutamat als einziger N-Quelle keine niedrigere spezifische Aktivität der NAD-GluDH gefunden. In Hefe setzte dagegen in dem Glutamatmedium eine starke derepressive Bildung der NAD-GluDH ein.

AMES und GARRY (1959) berichteten erstmals, daß ein Endprodukt einer Biosynthesekette (Histidin) bei Salmonella typhimurium die Synthese der letzten vier Enzyme dieser Kette gleichzeitig reprimiert. Nach dem Modell von MONOD (1959) und JACOB und MONOD (1961) würde die Histidyl-t-RNS als Corepressor wirken, indem sie sich mit dem vom Regulatorgen produzierten Repressor verbindet,

der daraufhin das Operatorgen blockiert. Im Falle der Histidin-Synthese bei Salmonella typhimurium liegen die Strukturgene der letzten vier Enzyme der Synthesekette auf dem zu diesem Operatorgen gehörigen Operon (AMES und HARTMANN 1963). Diese Enzyme werden unabhängig von der Synthesegeschwindigkeit jeweils im gleichen Verhältnis zueinander gebildet. Man spricht daher von einer koordinierten Repression der Enzyme. Ähnliche Verhältnisse scheinen auch bei Hydrogenomonas H16 vorzuliegen. Überträgt man H16 von einem ammoniakhaltigen Medium in ein Medium ohne N-Quelle, so steigt nicht nur die spezifische Aktivität der NAD-GluDH, sondern auch die Aktivität der Glutamin-Synthetase an. Dieser Anstieg erfolgt qualitativ und quantitativ parallel zueinander. Die gleichzeitige Synthese der Urease unter diesen Bedingungen erfolgt unabhängig von der Bildung der beiden anderen Enzyme. Ähnlich wurde auch an Saccharomyces cerivisiae-Zellen eine gleichartige Bildung von NAD-GluDH und Glutamin-Synthetase nach Übertragung von einem ammoniakhaltigen Medium in eine Nährlösung beobachtet, die Valin als einzige N-Quelle enthielt (KOHLHAW et al. 1965). Offenbar werden bei Saccharomyces cerivisiae und bei Hydrogenomonas H16 die NAD-GluDH und die Glutamin-Synthetase wie die Histidinsynthe seenzyme koordiniert reprimiert.

Die höchsten spezifischen Aktivitäten der NADP-GluDH fanden sich in den Zellen, die mit Ammonium-Ionen als einziger oder als zusätzlicher N-Quelle gewachsen waren. Unter N-Mangelbedingungen sank die spezifische Aktivität dagegen um die Hälfte ab. Entsprechende Beobachtungen liegen an E. coli (WOOLFOLK et al. 1966) und an Neurospora crassa (SANWAL und LATA 1962) vor. Ob dieses Verhalten der NADP-GluDH auf einer Induktion durch Ammonium-Ionen, einer Inaktivierung in Abwesenheit von Ammonium-Ionen oder einem aktiven Abbau des Enzyms unter N-Mangel beruht, kann nach den bisher vorliegenden Untersuchungen nicht entschieden werden.

Eindeutige Befunde, daß ein durch N-Quellen reprimierbares Enzym unter N-Mangelbedingungen derepressiv gebildet wird, liegen bisher lediglich für die Urease bei Hydrogenomonas H16, für die

Glutamin-Synthetase bei E. coli (WOOLFOLK et al. 1966) und für die Arginase und die Ornithintransaminase bei verschiedenen Hefestämmen vor (MIDDELHOVEN 1968). In Saccharomyces cerivisiae reprimiert offenbar Ammoniak die Bildung der NAD-GluDH und der Threonin-Desaminase (HIERHOLZER und HOLZER 1963, HOLZER et al. 1963). Die spezifischen Aktivitäten dieser Enzyme, die nach Wachstum mit Ammoniak gefunden wurden, waren bei diesem Organismus immer geringer als die spezifischen Aktivtitäten nach Anzucht mit Aminosäure als einziger N-Quelle. Überträgt man die Zellen jedoch von einem Glucose/Ammoniak-Medium in eine vollständige Nährlösung ohne N-Quelle, so wird weder die Threonin-Desaminase noch die NAD-GluDH synthetisiert (MIDDELHOVEN 1968). Im Gegensatz zu den unter N-Mangel gemessenen spezifischen Aktivitäten der NAD-GluDH war die Aktivität dieses Enzyms in einem Glucose/Pepton-Medium sogar wesentlich höher.

Der Einfluß exogener N-Quellen auf den Stickstoffhaushalt der Zellen ist von zahlreichen Arbeitsgruppen untersucht worden. Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse hatten gezeigt, daß in Abwesenheit einer äußeren N-Quelle die Urease, die NAD-GluDH und die Glutamin-Synthetase bei Hydrogenomonas H16 synthetisiert werden. Damit stellt sich die Frage, auf welchem Weg H16 den für die Biosynthese dieser Enzyme notwendigen Stickstoff bereitstellt. Der größte Teil des Stickstoffs in der Zelle liegt in Form von Proteinen und Nucleinsäuren vor. Der Anteil der freien Aminosäuren in der Zelle beträgt nur 0,4 % von der Gesamtmenge der Aminosäuren in der Zelle (MANDELSTAM 1958 a). Die Untersuchungen von STENT und BRENNER (1961) und NEIDHARDT (1962 u. 1966) hatten erkennen lassen, daß die RNS-Synthese über den Aminosäurepool auf genetischem Wege kontrolliert wird. Ein hoher Pool an Aminosäuren induziert die RNS-Synthese durch Bildung von Aminoacyl-t-RNS. In Neurospora crassa erniedrigte sich tatsächlich in Abwesenheit einer äußeren N-Quelle der Anteil der freien Aminosäuren in der Zelle (AURICH 1966). Damit würde unter N-Mangel die Synthese der RNS verhindert werden. Neben der Einstellung neuer Synthesen scheint aber auch ein Abbau der Nucleinsäuren

zu erfolgen. Bei E. coli hängt die Wachstumsrate und der RNS-Gehalt der Zellen eng zusammen (NEIDHARDT und MAGASANIK 1960, SCHAECHTER et al. 1958). Bei Chlorella pyrenoidosa sinkt unter N-Mangel der ribosomale RNS-Anteil stark ab.Der DNS-Gehalt steigt dagegen unter diesen Bedingungen an. Nach Wachstum unter extremem N-Mangel besteht deshalb die Gesamtmenge der Nucleinsäuren der Zelle bis zu 2/3 aus DNS (NEWMARK und FUJIMOTO 1959, GALLING 1965). Ähnliche Befunde wurden an Neurospora crassa, Candida brumptii und Pseudomonas aeruginosa erhalten. Bei verminderter Ammoniakkonzentration im Nährmedium nahm auch die Konzentration der Nucleinsäuren deutlich ab (KLEBER und AURICH 1968). Daß in Hydrogenomonas H16 unter N-Mangel keine Induktion der am Purinabbau beteiligten Enzyme feststellbar war (KALTWASSER 1968), widerspricht den an anderen Organismen gemachten Befunden. Der endogene Purinabbau könnte allerdings ohne Induktion der beteiligten Enzyme erfolgen, denn von den gemessenen Enzymen des Purinabbaues konnten die Uricase und die Glyoxylatcarboligase mit niedriger spezifischer Aktivität auch nach Anzucht mit Fructose/Ammoniumchlorid nachgewiesen werden (KALTWASSER 1968 b). Größere Bedeutung als der Abbau der Nucleinsäuren könnte bei vielen Organismen der Protein-turnover unter N-Mangelbedingungen haben. In Pseudomonas aeruginosa und Neurospora crassa sinkt bei verminderter Ammoniakkonzentration nicht nur die Nucleinsäurekonzentration, sondern auch der Gehalt an Proteinen und an Coenzymen (KLEBER und AURICH 1968). In Bacillus licheniformis wird in der stationären Wachstumsphase zur Sporulation Zellprotein in freie Aminosäuren abgebaut, die zur neuen Synthese von Sporenenzymen und zur Gewinnung von Energie verwendet werden (RAMALEY und BERNLOHR 1966). Die Untersuchungen an E. coli hatten zudem gezeigt, daß im Gegensatz zu den Befunden an Neurospora crassa der Anteil der freien Aminosäuren von 0,4 % unter normalen Wachstumsbedingungen auf 0,8 % im Verlaufe der N-Verarmung anstieg (MANDELSTAM 1957, 1958 a und b). Diese aus dem endogenen Abbau zelleigener Proteine gebildeten Aminosäuren könnten ausreichen, um die gezielte Biosynthese von bestimmten Enzymen in Abwesenheit einer äußeren N-Quelle zu bilden (KALTWASSER 1968 b). Der Umbau der Proteine

macht sich in der Gesamtmenge des Zellproteins nicht bemerkbar. Einem ähnlichen Abbau unter N-Mangel könnte auch die NADP-spezifische Glutamat-Dehydrogenase in Hydrogenomonas H16 unterliegen.

3. Pyrimidinverwertung

Untersuchungen an Hefe und an E. coli (HAHN und LINTZEL 1923, HAHN und SCHÄFER 1925, HAHN und HARTMANN 1926) hatten erkennen lassen, daß auch bei diesen Organismen ähnlich wie bei Hydrogenomonas H16 Cytosin und 5-Methylcytosin lediglich desaminiert und das entstehende Uracil bzw. Thymin nicht weiter angegriffen werden. Auf Stämme dieser Organismen beschränken sich weitere Beobachtungen über den mikrobiellen Cytosinabbau (IWATSURU und CHIKANO 1923, CIHAK und SORM 1965, LOCHMANN 1965). Über detailierte Untersuchungen an Hefe berichteten CHARGAFF u. KREAM (1948) und KREAM und CHARGAFF (1950 und 1952 a). Die spezifische Enzymaktivität wurde bei der Reinigung und Isolierung der Cytosin-Desaminase durch Messung des papierchromatographisch isolierten Uracils ermittelt (KREAM und CHARGAFF 1952 b). In vereinfachter Form konnte diese Methode auch für die Messung des Enzyms aus Extrakten von Hydrogenomonas H16 angewendet werden, weil dabei keine Folgeprodukte durch den weiteren Uracilabbau gebildet werden. Die Messung der Enzymaktivität mit Hilfe des gekoppelten optischen Testes erwies sich jedoch als das einfachere Verfahren.

Auf Grund ihres Verhaltens gegenüber Pyrimidinderivaten lassen sich die beiden Hydrogenomonasstämme H16 und H. facilis leicht unterscheiden. Charakteristisch ist vor allem das Unvermögen von Hydrogenomonas H16, Uracil zu verwerten. Außerdem bildet H. facilis während des Wachstums mit begrenzender Cytosinmenge dreimal so viel Protein wie Hydrogenomonas H16 - ein Unterschied, der sich unter Verwendung kleiner Nährlösungsvolumina mit geringem Aufwand feststellen läßt (KALTWASSER 1968).

Den weiteren Abbau des Desaminierungsproduktes Uracil versuchten seit der Jahrhundertwende zahlreiche Arbeitsgruppen zu klären.

VonCERECEDO(1927, 1931) wurde ein erstes Abbauschema postuliert: Beim einleitenden oxidativen Angriff auf das Uracil sollte Isobarbitursäure gebildet werden, die über Isodialursäure und Oxalursäure in Oxalsäure und Harnstoff zerlegt werden könnte. Erst bei den Untersuchungen an Stämmen von Mycobacterium, Corynebacterium und einem nicht näher identifizierten Bodenbakterium konnten eindeutige Befunde über den Abbaumechanismus zumindestens bei Bakterien erhalten werden (HAIYAISHI und KORNBERG 1951 und 1952, WANG und LAMPEN 1952, BIGGS und DOUMAS 1963). Im Folgenden zeigte sich jedoch, daß dieser oxidative Abbauweg über Barbitursäure nicht identisch mit dem in tierischen Geweben war. Untersuchungen an der Rattenleber ergaben, daß die Pyrimidinderivate Uracil und Thymin nach einem reduktiven Mechanismus über die entsprechenden Dihydroverbindungen abgebaut werden (FINK et al. 1952 und 1953). Die Annahme, daß für die Bakterien der oxidative Abbauweg charakteristisch ist, wurde durch die Befunde an Pseudomonas aeruginosa und Clostridium uracilicum widerlegt. Nach Wachstum von Pseudomonas aeruginosa mit Uracil oder Thymin wiesen FINK et al. (1954) alle Intermediärprodukte des reduktiven Pyrimidinabbaues im Nährmedium nach. In Clostridium uracilicum konnten die für den reduktiven Uracilabbau verantwortlichen Enzyme nachgewiesen werden (CAMPBELL 1957 a). Die vorliegenden Untersuchungen an Hydrogenomonas facilis hatten ergeben, daß die Uracil- und Thyminverwertung ebenfalls über die Intermediärprodukte des reduktiven Abbauweges erfolgt. Dieses Abbauschema konnte durch Induktionsversuche an intakten Zellen, Isolierung der Zwischenprodukte, Messung der Uracil verwertenden Enzyme und auf Grund von Defektmutanten, die die Intermediärverbindungen in das Medium ausschieden, eindeutig nachgewiesen werden.

Bei H. facilis wurden die ersten drei Enzyme des Cytosinabbaues induktiv gebildet. Auch in Clostridium uracilicum konnte die Dihydrouracil-Dehydrogenase, die Dihydrouracil-Hydrase und die 3-Ureidopropionase nur in Zellen nachgewiesen werden, die mit Uracil angezogen worden waren (CAMPBELL 1957 a). Offenbar unterliegen jedoch nicht alle am Abbau des Cytosins beteiligten Enzyme

einer induktiven Bildung: β-Alanin wurde durch Zellen von H. facilis, die mit Uracil als N-Quelle gewachsen waren, ebenso gut oxidiert wie von Zellen, die mit Ammoniumchlorid angezogen worden waren. Zur näheren Untersuchung der Bedingungen, die zur Bildung der Cytosin verwertenden Enzyme führen, wurden die ersten drei Glieder der Abbaukette einer näheren Prüfung unterzogen. Dabei zeigte sich, daß lediglich die Cytosin-Desaminase in einem Ammoniumchloridmedium eine relativ hohe spezifische Aktivität besaß. Die Dihydrouracil-Dehydrogenase und die Dihydrouracil-Hydrase hatten dagegen in diesem Medium keine bzw. nur schwach nachweisbare Enzymaktivitäten. Die induktive Bildung der Uracil abbauenden Enzyme begann nicht nur während des Wachstums mit Uracil, sondern auch während der Anzucht mit Thymin oder Orotsäure. Auf Grund von Induktionsversuchen an intakten Zellen, Messung der Enzymaktivitäten und Untersuchungen an Mutanten, die Dihydrouracil-Dehydrogenase oder Dihydrouracil-Hydrase nicht mehr zu bilden vermochten, wurde gezeigt, daß Uracil und Thymin durch dieselben Enzyme abgebaut werden. Die Synthese der Dihydrouracil-Dehydrogenase und der Dihydrouracil-Hydrase konnten sowohl durch Uracil als auch durch Thymin oder deren Nachfolgeprodukte induziert werden. Der Abbau von Uracil und Thymin durch eine einzige Enzymkette scheint in der Natur kein vereinzelt auftretender Fall zu sein. Bei Stämmen von Mycobacterien wird Thymin und Uracil durch ein Enzym, die Uracil/Thymin-Oxidase, in 5-Methylbarbitursäure bzw. in Barbitursäure übergeführt (HAYAISHI und KORNBERG 1952). Die gereinigte Barbiturase, die den nächsten Schritt in der Abbaukette katalysiert, reagiert dagegen nur mit Barbitursäure aber nicht mit 5-Methylbarbitursäure. Die Untersuchungen an Erbsenpflanzen schließen nicht aus, daß für die Hydrolyse des Dihydrouracils, des Dihydrothymins und des Dihydroorotats nur ein Enzym verantwortlich ist (MAZUS und BUCHOWITZ 1966). Allerdings sind diese Befunde an einem wenig gereinigten Enzympräparat erhalten worden. In Kalbs- und Rattenleber katalysiert die Dihydrouracil-Dehydrogenase und die Dihydrouracil-Hydrase sowohl den Uracil- als auch den Thyminabbau (GRISOLIA und CARDOSO 1957, WALLACH und GRISOLIA 1957, FRITZON 1960, BARRET et al. 1964). Wie die tieri-

sche Dihydrouracil-Dehydrogenase ist das Enzym bei H. facilis spezifisch für NADP als Coenzym, während es in Clostridium uracilicum nur mit NAD reagiert (CAMPBELL 1957 ).

Die vorliegenden Untersuchungen hatten gezeigt, daß bei H. facilis die Uracil verwertenden Enzyme induktiv gebildet werden. Im tierischen Organismus treten dagegen andere Prozesse in den Vordergrund, die die Abbaugeschwindigkeit regulieren. Einerseits wird ähnlich wie bei H. facilis die Geschwindigkeit der Uracilverwertung in der Rattenleber durch die einleitende Reduktion zum Dihydrouracil begrenzt (CANELLAKIS 1956). Andrerseits kann aber der Substratdurchsatz auch durch direkte Beeinflussung der Enzymaktivitäten verändert werden. Die Überführung des Uracils in Dihydrouracil wird durch Thymin, die Dihydrothyminbildung durch Uracil gehemmt (BARRET et al. 1964). Außer Thymin hemmen auch Purine (Xanthin und Harnsäure) und Orotsäure die Dihydrouracil-Dehydrogenase (PITHOVA und SORM 1963). Wichtig scheint ferner die aktive Aufnahme des Uracils in die Zelle zu sein. Dieser Transport ist in tierischen Geweben sauerstoffabhängig und kann durch uracilähnliche Pyrimidine blockiert werden (SCHANKER und TOCCO 1962).

Von zahlreichen Organismen ist bekannt, daß sie freie Pyrimidine zur Nucleosid- oder Nucleinsäuresynthese verwenden können. Es stellt sich deshalb die Frage, welche Bedeutung der reduktive Uracil/Thymin-Abbauweg für die Synthese der RNS und DNS hat. In tierischen Geweben und in Hefezellen wird in allen Fällen, in denen Orotsäure zur RNS-Synthese genutzt wird, auch Dihydrouracil und 3-Ureidopropionat in die Nucleinsäure eingebaut (MOKRASCH und GRISOLIA 1958 u. 1959). Das Verhältnis der Einbauraten von Dihydrouracil zu Orotat ist dabei in Hefezellen 0,7 : 8,3. Die physiologische Bedeutung dieser Einbaureaktion bleibt aber in Abwesenheit von äußerem Dihydrouracil oder 3-Ureidopropionat zweifelhaft, da das 3-Ureidopropionat aus Ammoniak, Kohlendioxid und ß-Alanin nicht synthetisiert werden kann (CAMPBELL 1960, CARAVACA und GRISOLIA 1958). Allerdings zeigten bereits GRISOLIA

und WALLACH (1955), daß 3-Ureidopropionat aus Carbamylphosphat und ß-Alanin durch Bakterien und durch Mitochondrien gebildet wird. Auf Carbamylphosphat als Intermediärprodukt beim reduktiven Uracilabbau weist der Befund hin, daß bei Clostridium uracilicum während des Wachstums mit Uracil ein Enzym induziert wird, das Carbamylphosphat spaltet (CAMPBELL 1957 a). Wäre die Synthese von 3-Ureidopropionat aus Carbamylphosphat und ß-Alanin eine physiologische Reaktion, so stände der Zelle damit neben der Bildung über Orotsäure ein zweiter Weg zur Synthese der Pyrimidinbasen zur Verfügung.

## ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei einer Anzahl von Bakterienarten und -stämmen wurde die Ureaseaktivität nach Anzucht der Zellen unter N-Mangel und unter N-Überschuß gemessen. Drei Gruppen von Bakterienstämmen können unterschieden werden. Die erste Gruppe umfaßt die Stämme, in denen sich keine Urease nachweisen läßt. Die Stämme der zweiten Gruppe bilden das Enzym sowohl in N-reichen als auch in N-verarmten Zellen; die Ureasebildung wird nicht reprimiert. Bei einer dritten Gruppe haben nur die N-Mangelzellen eine hohe spezifische Aktivität, sie liegt um das 20 - 250fache über derjenigen von Zellen aus stickstoffreichem Medium. Ammonium-Ionen oder komplexe Stickstoffverbindungen reprimieren bei diesen Stämmen die Ureasebildung.

2. Herkömmliche Indikatornährböden mit hohem N-Gehalt lassen bei reprimierbaren Stämmen das Vermögen Urease zu bilden nicht in jedem Falle erkennen. Auf einem Indikatornährboden mit wachstumsbegrenzendem Ammoniakgehalt wird der urease-positive Charakter auch der reprimierbaren Stämme sichtbar.

3. Von Hydrogenomonas H16 ließen sich 5 Mutanten isolieren, die nicht mit Harnstoff wachsen können aber dennoch Urease bilden. Diese Mutanten vermögen auch 3-Ureidopropionat, Cytosin und ß-Alanin nicht mehr als N-Quelle zu nutzen.

4. Hydrogenomonas H16 bildet unter autotrophen und heterotrophen Wachstumsbedingungen zwei Glutamat-Dehydrogenasen, die sich in ihrer Coenzymspezifität, in der Regulation ihrer Biosynthesen und in ihrem Verhalten gegenüber starker Erhitzung unterscheiden.

5. Unter N-Mangel bildet Hydrogenomonas H16 neben der Urease auch die Glutamin-Synthetase und die NAD-spezifische Glutamat-Dehydrogenase. Die NAD-Glutamat-Dehydrogenase und die Glutamin-Synthetase werden unabhängig von der Synthesegeschwindigkeit jeweils im gleichen Verhältnis zueinander gebildet. Die Urease wird unabhängig von diesen beiden Enzymen synthetisiert.

6. Die NADP-spezifische Glutamat-Dehydrogenase bei Hydrogenomonas H16 hat im Gegensatz zur NAD-Glutamat-Dehydrogenase nur in einem N-reichen Medium hohe spezifische Aktivitäten. Unter N-Mangel sinkt die spezifische Aktivität stark ab.

7. Hydrogenomonas H16 baut Cytosin nur unvollständig ab. Das beim Wachstum mit Cytosin gebildete Desaminierungsprodukt Uracil wird quantitativ im Medium angehäuft. Die Cytosin-Desaminase wird in Gegenwart von Cytosin induktiv gebildet.

8. Hydrogenomonas facilis kann alle drei Stickstoffatome des Cytosinmoleküls zur Proteinsynthese nutzen. Dabei wird das Cytosin über Uracil, Dihydrouracil, 3-Ureidopropionat und ß-Alanin abgebaut. Der Organismus vermag alle Intermediärprodukte als N-Quelle, aber nur ß-Alanin als C- und Energiequelle zu verwerten. Während des Wachstums mit Pyrimidinderivaten wird die Urease dereprimiert; diese Derepression läßt sich durch die geringe Konzentration an Ammonium-Ionen in der Zelle erklären.

9. Die ersten drei Enzyme des reduktiven Cytosinabbaues bei H. facilis, die Cytosin-Desaminase, die Dihydrouracil-Dehydrogenase und die Dihydrouracil-Hydrase, werden während des Wachstums mit Cytosin und Uracil induktiv gebildet. Die Cytosin-Desaminase hat auch in Abwesenheit von den genannten Pyrimidinen eine relativ hohe spezifische Aktivität. Im Gegensatz zu den anderen Intermediärprodukten des Cytosinabbaues wird ß-Alanin von Zellen, die mit Ammoniumchlorid gewachsen waren, mit der gleichen Rate oxidiert, wie von Zellen, die mit Uracil gewachsen waren.

10. Nach Behandlung mit 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin als mutagenes Agenz und nach Anreicherung in einem penicillinhaltigen Medium ließen sich von H. facilis 35 Mutanten isolieren, die Uracil nicht als N-Quelle zu nutzen vermögen. Diese Mutanten scheiden während des Wachstums mit Cytosin Uracil oder Dihydrouracil in das Nährmedium aus.

11. Orotsäure wird durch H. facilis offenbar über Uracil als Intermediärprodukt abgebaut; während des Wachstums mit Cytosin werden die Cytosin-Desaminase, die Dihydrouracil-Dehydrogenase und die Dihydrouracil-Hydrase aber nicht die Enzyme des reduktiven Orotsäureabbaues (Dihydroorotat-Dehydrogenase und Dihydroorotat-Hydrase) gebildet; Mutanten, die Uracil nicht mehr als N-Quelle verwerten können, vermögen auch mit Orotsäure nicht mehr zu wachsen.

12. Thymin und Uracil werden bei H. facilis durch ein und dieselbe Enzymkette abgebaut. Die Bildung dieser Enzyme kann sowohl durch Thymin als auch durch Uracil oder deren Folgeprodukte induziert werden. Das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase mit Uracil und mit Thymin als Substrat ist bei verschiedenen spezifischen Aktivitäten des Enzyms immer gleich groß, entsprechendes gilt für die Dihydropyrimidin-Hydrase. Mutanten, die Uracil oder Dihydrouracil nicht mehr als N-Quelle verwerten können, vermögen auch nicht mit Thymin bzw. Dihydrothymin zu wachsen. Die eine Gruppe dieser Mutanten hat die Fähigkeit verloren, die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase zu sythetisieren, die unspezifisch mit Uracil und Thymin reagiert; die andere Gruppe der Mutanten kann die Dihydropyrimidin-Hydrase nicht mehr bilden, die unspezifisch die Dihydrouracil- und Dihydrothyminhydrolyse katalysiert.

METHODEN

Organismen

Micrococcus cerificans wurde von Dr. C.Finnerty, Iowa (USA) und Vibrio 01 von Dr. C.A.Fewson, Glasgow (U.K.) zur Verfügung gestellt. Alle übrigen Bakterienstämme entstammen der Sammlung des Institutes für Mikrobiologie in Göttingen

Anzucht

Die chemolithotrophe Anzucht der Hydrogenomonasstämme auf festen Agarplatten und in Flüssigkeitskultur erfolgte in der Minerallösung nach SCHLEGEL et al. (1961) unter einer Gasatmosphäre mit 10 % $O_2$, 80 % $H_2$ und 10 % $CO_2$ bei 28°C. Heterotroph wurden die verschiedenen Bakterienstämme im gleichen Mineralmedium unter Zusatz von Fructose (FM) oder Glucose als C- und Energiequelle und Trypton (Try), Hefeextrakt (He), Nutrient-Broth (NB), $NH_4Cl$ oder Harnstoff als N-Quelle angezogen. Der Nährlösung für Proteus vulgaris wurden zusätzlich 0,1γ Nikotinsäure je ml zugefügt. Zur Anzucht von N-Mangelzellen wurden wachstumsbegrenzende Mengen der jeweiligen N-Quelle verwendet (1,2 g NB/Liter, 0,63 g Try/Liter, 0,63 g He/Liter, 0,5 g $NH_4Cl$/Liter). Das Wachstum wurde durch Trübungsmessung verfolgt und die Kultur 10 Stunden nach Eintritt in die stationäre Wachstumsphase geerntet. Die Anzucht der Zellen bis zu 150 ml NL erfolgte in Schüttelkultur (1 l Erlenmeyerkolben), bis zu drei Liter NL in Rührkultur (6 l Rührkolben) nach SCHLEGEL et al. (1961) und bis zu 12 l NL in der Fermentereinheit "Microferm", New Brunswick Scientific Co, Inc., New Brunswick (USA).

Messung des Bakterienwachstums

1. Zellzählung

Zur Zellzahlbestimmung wurde die Zählkammer nach Neubauer verwendet (0,01 mm, $1/_{400}$ qmm).

2. Trübungsmessung

Die Messung der Bakteriendichte erfolgte durch Bestimmung der Extinktion bei 550 nm im Zeiss-Photometer Elko II (d = 1 cm) in einem Extinktionsbereich zwischen 0 und 0,3.

3. Lebendzellzahlbestimmung

Die Anzahl der lebenden Zellen je ml Nährlösung wurde durch Ausspateln einer günstigen Verdünnung der Bakteriensuspension auf Agarplatten und Auszählen der gewachsenen Kolonien nach 1 - 4 Tagen ermittelt.

4. Proteinbestimmung ganzer Zellen

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der von LA RIVIERE (1958) angegebenen Methode. Eichkurven wurden mit Rinderserumalbumin als Standard aufgenommen.

Herstellung von H16-Mutanten nach REH (1967)

Die Mutationsauslösung erfolgte mit Nitrit als mutagenes Agenz. Zur Anreicherung von H16-Mutanten, die nicht mehr mit Harnstoff zu wachsen vermögen, wurden die mit Nitrit behandelten und 2 Tage in angereichertem FM gewachsenen Zellen eine Stunde zur Verarmung der intrazellulären Aminosäurereserven bei 28°C in einem N-freien Medium geschüttelt. Dann wurde zu 5 ml Suspension ($5 \times 10^7$ Zellen/ml) 0,05 ml Colistinsulfatlösung (Endkonzentration 50 µg/ml) und 0,05 ml Harnstofflösung (Endkonzentration 5 µmole/ml) zugesetzt und bei 28°C geschüttelt. Nach 8 Stunden wurde die Suspension abzentrifugiert, einmal mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen und erneut mit Colistinsulfat und Harnstoff versetzt und bei 28°C geschüttelt. Nach 12 Stunden wurde die Abtötung der wachsenden Zellen durch Verdünnen und Ausplattieren auf FM/$NH_4Cl$-Platten abgestoppt. Die gut gewachsenen Kolonien wurden nach 3 bis 4 Tagen nach der von LEDERBERG u. LEDERBERG (1952) beschriebenen Methode mit sterilem Samt auf Agarnährböden mit $NH_4Cl$ bzw.

Harnstoff als N-Quelle gestempelt. Die Kolonien, die auf dem $NH_4Cl$- nicht aber auf dem Harnstoffnährboden gewachsen waren, wurden abgeimpft und zur Isolierung von Einzelkolonien auf FM/$NH_4Cl$-Platten ausgestrichen.

Herstellung von Hydrogenomonas facilis-Mutanten

1. Mutationsauslösung mit 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin (NMG)

Mit 1 ml einer autotroph gewachsenen Kultur (E 550 nm = 0,2-0,3) wurden 100 ml FM beimpft und bei 28°C geschüttelt. Nach 16 Stunden befanden sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase (ca. 1x $10^8$ Zellen/ml). Zu 10 ml dieser wachsenden Kultur wurden dann 0,6 ml NMG (20 mg NMG/30 ml) zugesetzt, so daß die Endkonzentration 40 µg/ml Suspension betrug.

2. Anreicherung der Mutanten

Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 30°C wurde die Mutationsauslösung durch Absaugen der Nährlösung (Membranfilter: Typ MF 14, Sartorius Membranfilter) und zweimaligem Waschen mit Salzlösung abgestoppt. Die Zellen wurden wieder in 10 ml NB resuspendiert. 4 ml dieser Suspension wurde mit 6 ml NB versetzt und 2 Tage bei 28°C geschüttelt. Die gut gewachsene Kultur wurde abzentrifugiert und in N-freier Nährlösung aufgenommen (1x $10^9$ Zellen/ml). Mit 0,5 ml dieser Suspension wurden 8,5 ml FM ohne N-Quelle beimpft, 5 Stunden bei 28°C geschüttelt und mit 1 ml einer N-Quelle (Uracil) versetzt. Nach weiteren 5 Stunden wurde 0,15 ml Penicillinlösung (Penicillin "Göttingen", Göttinger Penicillingesellschaft) und Sacheroselösung zupipettiert (Endkonzentration 300 I.E. Penicillin/ml Suspension bzw. 20 % Sacherose) und bei 28°C inkubiert. Nach 10 Stunden wurde die Abtötung durch Verdünnen mit Salzlösung und Ausplattieren auf FM/$NH_4Cl$-Platten abgestoppt.

Bestimmung von spezifischen Enzymaktivitäten

Die spezifische Enzymaktivität wurde in Einheiten pro g Protein (E/g) angegeben; eine Einheit (E) ist der Umsatz von 1 µmol Substrat je Minute.

1. Urease (KALTWASSER u. SCHLEGEL 1966)

Ansatz:

| | | |
|---|---|---|
| 2,55 ml | | Mix-Puffer: 2,45 ml 0,05 M Tris, pH 8,0; 0,01 ml 0,25 M α-KGS, pH 7,0; 0,06 ml $NADH_2$ (10 mg/ml); 0,03 ml Aqua dest. |
| 0,10 ml | 0,3 M | $Na_2S$ |
| 0,05 ml | | GluDH (10 mg/ml Glycerin) |
| 0,20 ml | | Rohextrakt |
| 0,10 ml | 0,3 M | Harnstoff |

2. NADP/NAD-spezifische Glutamat-Dehydrogenase (OLSON u. ANFINSEN 1952)

Ansatz:

| | | |
|---|---|---|
| 2,54 ml | 0,05 M | Tris, pH 8,0; |
| 0,06 ml | | $NAD(P)H_2$ (10 mg/ml) |
| 0,10 ml | 0,25 M | α-KGS |
| 0,10 ml | | EDTA (10 mg/ml) |
| 0,10 ml | | Rohextrakt |
| 0,10 ml | | $NH_4Cl$ (1 g/10 ml) |

3. Glutamin-Synthetase (Test nach ELLIOT 1953; LIPMANN u. TUTTLE 1945; KOHLHAW et al. 1965)

Ansatz:

| | |
|---|---|
| 1,6 ml | Mix-Puffer: 42 mg Glutamat; 25 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,6 ml 0,05 M Tris-Puffer, pH 8,0 |
| 0,10 ml | Hydroxylamin (70 mg/ml), pH 7,0 |
| 0,10 ml | Cystein · HCl (180 mg/ml), pH 7,0 |
| 0,10 ml | ATP (70 mg/ml), pH 7,0 |
| 0,10 ml | Rohextrakt |

Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 37°C wurde mit 2 ml folgender Lösung abgestoppt:

1 Teil 5%ige Fe (III)-Chloridlösung in 0,1 N HCl
1 Teil 10%ige TCE
1 Teil 2,5 N HCl

Der Niederschlag wurde 3 Minuten bei 10 000 g abzentrifugiert und das gebildete γ-Glutamylhydroxamat im Zeiss-Photometer Elko II bei 490 nm gemessen. Die spezifische Aktivität ist angegeben in Extinktionseinheiten/min/g Protein. Das Enzym hatte unter diesen Bedingungen ein breites pH-Optimum zwischen pH 8,0 und pH 8,7 (Abb. 23).

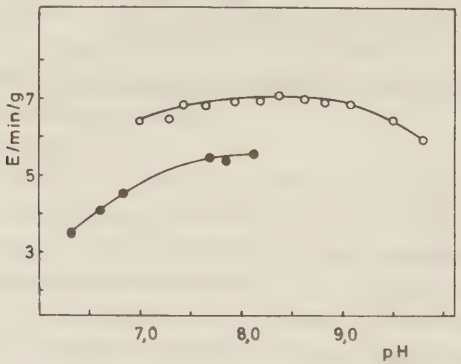



Abb. 23: Abhängigkeit der Glutamin-Synthetase-Reaktion vom pH-Wert im zellfreien Extrakt von Hydrogenomonas H16

Reaktionsgemisch: 1,6 ml Mix-Puffer (42 mg Glutamat, 25 mg $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$; 1,6 ml Puffer); 0,1 ml Hydroxylamin (70 mg/ml); 0,1 ml Cystein-HCl (180 mg/ml); 0,1 ml ATP (70 mg/ml); 0,02 ml Rohextrakt (20 mg Protein/ml); 0,08 ml Aqua dest.

0,05 M $KH_2PO_4$-Puffer ●——●
0,05 M Tris-Puffer O——O

Abb. 24 zeigt die Abhängigkeit der Syntheserate des γ-Glutamylhydroxamats von verschiedenen Rohextraktmengen. Danach verläuft die enzymatische Hydroxamatbildung nur bei Extraktmengen unterhalb von 0,04 ml (bei einem Proteingehalt von ca. 20 mg/ml)über

30 Minuten lang linear (KOHLHAW et al. 1965). Als optimal für zellfreie Extrakte von Hydrogenomonas H16 erwies sich eine Inkubationszeit von 15 Minuten bei 37°C und Extraktmengen von 0,01 bis 0,04 ml mit einem Proteingehalt von 10 bis 30 mg/ml.

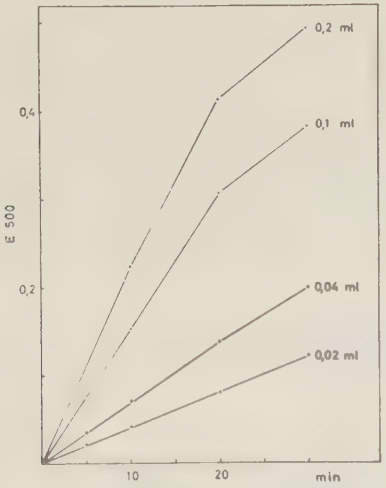



Abb. 24: Abhängigkeit der Syntheserate von γ-Glutamylhydroxamat von der Extraktmenge bei Hydrogenomonas H16
Versuchsbedingungen wie in Abb. 23

4. Cytosin-Desaminase

a) Gekoppelter optischer Test

Ansatz:

| | | |
|---|---|---|
| 1,73 ml | 0,05 M | Tris-Puffer, pH 8,0 |
| 0,01 ml | 0,25 M | α-KGS |
| 0,05 ml | 0,3 M | $Na_2S$ |
| o,05 ml | | GluDH (10 mg/ml Glycerin) |
| 0,06 ml | | $NADH_2$ (10 mg/ml) |
| 1,00 ml | | Cytosin (52 µmole/ml) |
| 0,10 ml | | Rohextrakt |

b) Bestimmung der gebildeten Uracilmenge

Ansatz:

| | |
|---|---|
| 2,7 ml | 0,05 M Tris-Puffer, pH 8,0; |
| 0,2 ml | Cytosin (20 µmole/ml) |
| 0,1 ml | Rohextrakt |

Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 30°C wurden 0,2 ml des Reaktionsgemisches mit 0,2 ml 10%iger TCE abgestoppt, mit 3,6 ml 0,1 N HCl verdünnt und abzentrifugiert (10 Minuten bei 12 000 g). Nach weiterer Verdünnung mit 0,1 N HCl wurde im Überstand durch Extinktionsmessungen bei 280 und 260 nm nach LORING (1955) die gebildete Uracilmenge ermittelt. Die spezifische Enzymaktivität ist angegeben in µmole freigesetztes Uracil/min/g Protein.

5. Dihydropyrimidin-Dehydrogenase
(verändert nach CAMPBELL 1957 b)

Ansatz:

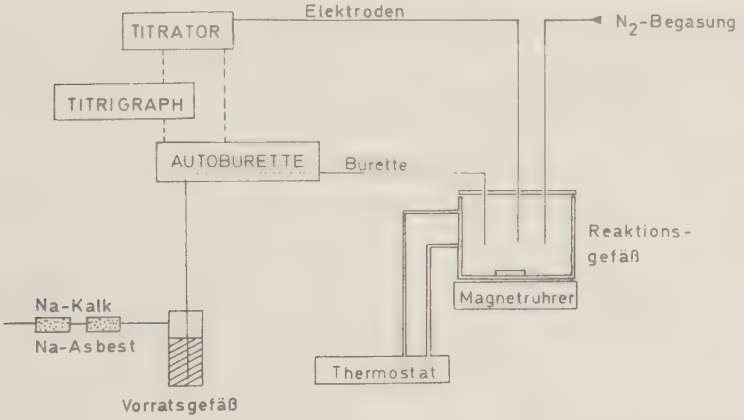
| | |
|---|---|
| 0,03 ml | $MgCl_2$ (10 µmole/ml) |
| 0,02 ml | $NADPH_2$ (10 mg/ml) |
| 0,85 ml | Uracil (65 mg/20 ml 0,05 M $KH_2PO_4$) bzw. Thymin (100 mg/25 ml 0,05 M $KH_2PO_4$) |
| 0,10 ml | dialysierter Rohextrakt |

Unter den angegebenen Bedingungen war die Dehydrogenase-Reaktionsgeschwindigkeit der zugesetzten Rohextraktmenge von Hydrogenomonas facilis in einem Bereich von 0,15 bis 0,60 mg Protein je Ansatz (1 ml) direkt proportional. Das Enzym von H. facilis hatte in einem 0,05 M $KH_2PO_4$-Puffer mit Uracil als Substrat bei einem pH-Wert von 6,8 seine höchste Reaktionsgeschwindigkeit. Die in 0,05 M Tris-Puffer gemessenen spezifischen Aktivitäten lagen um ca. 10 % unter den in 0,05 M $KH_2PO_4$-Puffer gemessenen Werten.

6. Dihydropyrimidin-Hydrase

2,5 ml Aqua dest. wurden bei 30°C inkubiert und 2 Minuten mit Stickstoff durchperlt. Nach Zusatz des Rohextraktes wurde das Reaktionsgemisch mit 0,01 bis 0,03 N NaOH auf pH 7,2 eingestellt. Mit 0,5 ml Dihydrouracil (40 µmole/ml) bzw. 0,5 ml Dihydrothymin (40 µmole/ml) wurde die Reaktion gestartet. Die spezifische Enzymaktivität ist angegeben in umole verbrauchter Lauge/min/g Protein.

Die titrimetrische Bestimmung der Dihydropyrimidin-Hydrase erfolgte mit Hilfe einer Titrationsausrüstung der Fa. Radiometer, Kopenhagen, Dänemark. Die schematische Versuchsanordnung ist in folgender Abbildung wiedergegeben:




In einem doppelwandigen Reaktionsgefäß wurde der Versuchsansatz unter $N_2$-Begasung und magnetischem Rühren bei 30°C inkubiert (Titrationseinheit Typ TTA31 und Ultrathermostat Colora der Fa. Pabst). Die bei der Hydrolyse der Dihydropyrimidine entstehende Säure wurde automatisch titriert (Titrator Typ TTT 1e und Autobürette Typ ABU 1b) und der Laugenverbrauch graphisch registriert (Titrigraph Typ SBR 2c). Das Vorratsgefäß mit der $CO_2$-freien NaOH war mit der Außenluft durch eine $CO_2$-absorbierende Einheit verbunden (Na-Kalk und Na-Asbest).

Manometrische Messungen

Die Zellen wurden abzentrifugiert, zweimal mit 0,066 M Phosphatpuffer gewaschen und in Mineralmedium nach SCHLEGEL et al. (1961) resuspendiert. Die Zellsuspensionsdichte wurde so eingestellt, daß die Gasaufnahme in einem günstigen Bereich lag. Als Warburg-Apparatur wurde ein Gerät der Fa. Braun, Melsungen (Typ P 85) benutzt. Als Gefäße wurden zweiarmige Standardgefäße mit Volumina zwischen 15 und 17 ml benutzt. Gefäße, in denen die Gasaufnahme in Abwesenheit von $CO_2$ gemessen werden sollte, enthielten 0,2 ml 20%ige KOH und einen Filterpapierfächer im Zentralzylinder. Versuchstemperatur 30°C.

Herstellung zellfreier Extrakte

Die Zellen wurden abzentrifugiert, zweimal mit o,066 M Phosphatpuffer pH 7,0 gewaschen, 1 bis 2 g gepackte Zellen in 5 ml des gleichen Puffers aufgenommen und bei -15°C gelagert. Zur Herstellung zellfreier Extrakte wurden die eingefrorenen Zellen aufgetaut und durch Ultraschall mit 300 Watt (30 Sekunden je ml Suspension) bei 0 bis +8°C aufgeschlossen (Ultra-Desintegrator der Fa. Schoeller u. Co, Frankfurt). Anschließend wurden die restlichen ganzen Zellen und größere Zelltrümmer durch 20 Minuten langes Zentrifugieren bei 0°C und 12 000 g abgetrennt. Der Überstand wurde im Folgenden als zellfreier Extrakt bezeichnet und entweder direkt zur enzymatischen Bestimmung eingesetzt oder über Nacht in 0,066 M strömendem $KH_2PO_4$-Puffer (pH 7,0) bei 0°C dialysiert (1 Liter Puffer pro 20 ml zellfreien Extraktes). Zur Proteinbestimmung nach LA RIVIERE (1958) wurden 0,1 bis 0,5 ml des zellfreien Extraktes mit Aqua dest. auf 4 ml aufgefüllt, mit 0,4 ml 16%iger NaOH versetzt, 5 Minuten lang auf 100°C im Wasserbad gebracht und rasch auf Zimmertemperatur abgekühlt. Anschließend wurde der Ansatz mit 1,6 ml eines Biuretreagenzes (5 g KNa-Tartrat; 4 g NaOH; 1 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$; 2,5 g KJ in 400 ml Aqua dest.) versetzt, vermischt und 20 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die optische Dichte wurde bei 550 nm

bestimmt. Mit Hilfe einer Eichkurve (Rinderserumalbumin) wurde der absolute Proteingehalt des zellfreien Extraktes ermittelt. (mg/ml).

Quantitative Bestimmungen

1. Fructose (DISCHE 1955)

Die Bestimmung erfolgte nach einer modifizierenden Seliwanoff-Reaktion. Dazu wurden zwei ml der Probelösung (ca. 10 - 50γ Fructose/ml) mit 1 ml einer Lösung von 0,1 g Resorcin und 0,25 g Thioharnstoff in 100 ml Eisessig und 7 ml einer Salzsäurelösung (450 ml 37%ige HCl und 90 ml $H_2O$) versetzt. Die Komponenten wurden gemischt und 10 Minuten lang bei 80°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde rasch auf Zimmertemperatur abgekühlt und die Extinktion des Reaktionsgemisches bei 520 nm bestimmt. Die absoluten Konzentrationen an Fructose in der Probelösung wurden aus den gleichzeitig ermittelten Werten der Eichkurve (10 - 50 γ Fructose/ml) bestimmt.

2. Harnstoff (Boehringer-Information, Test TCUR 15954)

Zur Bestimmung des Harnstoffs wurde 1 ml der harnstoffhaltigen zellfreien Lösung (maximal 0,5 µmole Harnstoff pro ml) 15 min lang mit 0,1 ml Urease (Boehringer-Urease, 1 mg/ml) und 0,9 ml Aqua dest. bei 37°C inkubiert. Der Ammoniumgehalt wurde dann nach der unten beschriebenen Methode bestimmt. Eine Eichkurve mit Harnstoff (0,1 - 0,5 µmole/ml) wurde gleichzeitig aufgenommen.

3. Ammoniumbestimmung (Boehringer-Information, Test TCUR 15954)

Zur Ammoniumbestimmung wurden 2 ml der zellfreien Probe (maximal 1 µmol $NH_4^+$/ml) mit 5 ml einer Phenollösung (0,106 M Phenol und 0,00017 M Nitroprussid-Na) und 5 ml einer Lösung von 0,011 M Na-Hypochlorid und 0,125 N Natriumhydroxid versetzt, durchmischt

und 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die Extinktion des gebildeten blauen Indophenolfarbstoffes der Proben und der Eichwerte (0,1 - 1,0 µmole $NH_4^+$/ml) wurden gegen einen Leerwert bei 550 nm im Zeiss-Photometer Elko II bestimmt.

4. Bestimmung von Pyrimidinen

Aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz

$$D_{\lambda 1} = C \cdot e_{\lambda 1}$$

läßt sich bei der Kenntnis des molaren Extinktionskoeffizienten e bei einer bestimmten Wellenlänge $\lambda_1$ durch Messung der Extinktion $D_{\lambda 1}$ bei dieser Wellenlänge die Konzentration C der absorbierenden Substanz direkt bestimmen.

5. Bestimmung von Uracil und Cytosin nebeneinander (LORING 1955)

Aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz ergibt sich für die Konzentration einer Komponenten B in einem Gemisch von A und B:

$$C_B = \frac{e_{A\lambda 2} D_{\lambda 1} - e_{A\lambda 1} D_{\lambda 2}}{e_{A\lambda 2} e_{B\lambda 1} - e_{A\lambda 1} e_{B\lambda 2}}$$

Entsprechendes gilt für die Berechnung der Konzentration der Substanz A. Zur Bestimmung von Uracil und Cytosin nebeneinander wurden die Wellenlängen $\lambda_1$ = 260 nm und $\lambda_2$ = 280 nm gewählt. Dann lassen sich die Konzentrationen von Uracil und Cytosin, wenn $D_\lambda$ die bei der Wellenlänge $\lambda$ gemessene Extinktion darstellt, wie folgt berechnen:

$$C_{Cytosin}\ (\mu mole/ml) = \frac{8{,}2 \cdot D_{260} - 1{,}6 \cdot D_{280}}{67{,}48}$$

$$C_{Uracil}\ (\mu mole/ml) = \frac{9{,}4 \cdot D_{280} - 6 \cdot D_{260}}{67{,}48}$$

6. Glutaminsäure (BERNT u. BERGMEYER 1962)

Da Ammonium-Ionen bei dieser Bestimmung stören, wurde die zellfreie Probe mit NaOH auf pH 9,0 eingestellt, eingefroren, 2 Tage im Vakuum lyophylisiert und im gleichen Volumen Aqua dest. wieder aufgenommen.

Ansatz für die Glutaminsäurebestimmung:

| | |
|---|---|
| 0,20 ml | $NH_4^+$-freie Probe (maximal 150 µg Glutaminsäure/ml) |
| 3,00 ml | Pufferlösung (3,75 g Glycin nach SÖRENSEN und 5,5 g ca. 24%iges Hydrazinhydrat werden mit 1 N $H_2SO_4$ auf pH 9,0 eingestellt und mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt) |
| 0,20 ml | $NADH_2$-Lösung (100mg $NADH_2$/5 ml) |
| 0,05 ml | GluDH-Lösung (Boehringer, 10 mg GluDH/ml Glycerin) |

Aus dem molaren Extinktionskoeffizienten von $NADH_2$ ($3,3 \cdot 10^6$ bei 366 nm) und einem Meßvolumen von 3,45 ml läßt sich aus der gemessenen Extinktionsänderung E bei 366 nm die Glutaminsäurekonzentration der Probe bestimmen:

$$\text{L-Glutamat (µmole/ml Probe)} = E_{366} \cdot 5{,}23$$

Papierchromatographische Identifizierug von Uracil, Cytosin Dihydrouracil, 3-Ureidopropionsäure, Aminosäuren und Harnstoff (FINK et al. 1956)

Als Lösungsmittel wurden Phenol/Wasser (3 : 1 - g : v), sek. Butanol/tert. Butanol/$H_2O$ (1 : 5 : 5 - v : v : v) oder wassergesättigtes n-Butanol in ein- oder zweidimensionalen absteigenden Chromatogrammen verwendet. Das Papier stammte von Schleicher u. Schüll (2043 b Mgl).

Die Pyrimidine lassen sich als dunkle Flecken unter einer UV-Lampe (260 nm) erkennen. Die Nachweisgrenze liegt bei 10 m umole Uracil/Cytosin je $cm^2$. Auch Dihydrouracil ergibt auf einem mit NaOH (0,8 g/100 ml) besprühten noch feuchten Chromatogramm unter einer UV-Lampe (260 nm) dunkle Absorptionsflecken.

Zur Identifizierung von Dihydrouracil wurde das Chromatogramm mit 0,5 N NaOH besprüht und ca. $1/_2$ Stunde lang feucht hängen gelassen. Nach dem Trocknen des Chromatogrammes wurde das durch Hydrolyse entstandene 3-Ureidopropionat wie unten beschrieben nachgewiesen.

Harnstoff und 3-Ureidopropionat gaben nach dem Besprühen mit einer Lösung von 1 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 95 ml 96%igem Äthanol und 5 ml konzentrierter HCl nach kurzem Trocknen in der Hitze gelbe Flecken, die bei 440 nm ihr Absorptionsmaximum hatten. Die Nachweisgrenze dieser Reaktion liegt bei 1mµmol Ureidoverbindung je $cm^2$. Barbitursäure gibt mit diesem Farbreagenz einen orange-roten Fleck.

Zum Nachweis von Aminosäuren wurde das getrocknete Chromatogramm mit folgendem Ninhydrinreagenz besprüht: 93 ml wassergesättigtes 1-Butanol, 7 ml Eisessig und 0,5 g Ninhydrin. Die Farbentwicklung konnte durch kurzes Erhitzen auf 60°C beschleunigt werden. Die Aminosäuren gaben sich als rötlich-violette Flecken zu erkennen. Die Ninhydrinflecken wurden durch das p-Dimethylaminobenzaldehyd-Reagenz wieder zerstört.

Ureasetest auf festen Nährböden (CHRISTENSEN 1946)

Eine kleine Menge (Impföse) von Bakterien einer Schrägröhrchenkultur wurde auf folgendem Nährboden ausgestrichen:

Zusammensetzung

| | |
|---|---|
| 1. Pepton | 1 g |
| NaCl | 5 g |
| $KH_2PO_4$ | 2 g |
| Phenolrot 0,2%ig | 6 ml |
| Aqua dest. | 800 ml |

Die Komponenten wurden gelöst, auf pH 6,8 eingestellt, 20 g Agar zugefügt und sterilisiert.

| | |
|---|---|
| 2. Glucose | 1 g |
| Aqua dest. | 100 ml |

Die Zuckerlösung wurde 30 Minuten bei 1,0 Atm. autoklaviert.

3. Harnstoff 20%ig 100 ml
Die Harnstofflösung wurde durch Filtration (Seitz Filter, EKS 6) sterilisiert. Lösung 2 und 3 wurden zu der noch heißen Lösung 1 (ca. 60°C) zugegeben, vermischt und in Platten gegossen.

Agartest auf Reprimierbarkeit bzw. Konstitutivität der Ureasebildung (KRÄMER et al. 1967)

Die Bakterien wurden in dünner Suspension auf Nährboden A und B ausgestrichen.

Nährboden A:

| | | |
|---|---|---|
| 1 g | $NH_4Cl$ | 5 mg Eisenammonium-citrat |
| 2 g | $KH_2PO_4$ | 5 ml 0,2%ige Phenolrotlösung |
| 0,2 g | $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ | Aqua dest. ad 800 ml |

Nach Lösen der Komponenten wurde der pH-Wert auf 6,8 eingestellt, 20 g Agar zugefügt und sterilisiert. Zu der noch heißen Lösung (60°C) wurde eine sterilisierte Zuckerlösung (2,5 g Glucose und 2,5 g Fructose in 100 ml) und 100 ml einer 20%igen sterilfiltrierten Harnstofflösung zugegeben.
Nährboden B wie Nährboden A jedoch ohne $NH_4Cl$

Biochemikalien

NAD(P), NAD(P)$H_2$, ATP, α-KGS, GluDH und Urease stammten von C.F. Boehringer & Soehne, Mannheim; Rinderserumalbumin von Grünenthal G.m.b.H., Stolberg; Penicillin von der Penicillingesellschaft Göttingen; NMG von L.Light and Co. Ltd., Colnbrook, England; Uracil, Cytosin, Orotsäure, Dihydroorotsäure, Thymin, Dihydrothymin, Dihydrouracil und 3-Ureidopropionat von der Sigma Chemical Company, St. Louis/USA und von The B. D. H. Ltd., Poole, England; Barbitursäure und 5-Methylcytosin von Fluka, Schweiz. Die übrigen p.a. Chemikalien stammten von E. Merck A.G. Darmstadt.

LITERATUR


AMES, B.N.
GARRY, B. 1959 Coordinate repression of the synthesis of four histidine biosynthetic enzymes by histidine. Proc.nat.Acad.Sci.45,1453 - 1461

AMES, B.N.
HARTMANN, P.E. 1963 The histidine operon. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 28,349-356

AMMANN,E.C.B.
REED, L.L. 1967 Metabolism of nitrogen compounds by Hydrogenomonas eutropha. Biochim.Biophys.Acta 141,135-143

ARCHIBALD, R.M. 1944 Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in bloodplasma. J.Biol.Chem. 156, 121-142

AURICH, H. 1966 Der Aminosäure-Pool von Neurospora: Veränderungen unter dem Einfluß exogener Faktoren. Antonie v. Leeuwenh. 32, 229-241

BAERET, H.W.
MUNAVALLI, S.N.
NEWMARK, P. 1964 Synthetic pyrimidines as inhibitors of uracil and thymine degradation by rat-liver supernatant. Biochim.Biophys.Acta 91, 199-204

BERNT, E.
BERGMEYER, H.U. 1962 L-Glutaminsäure (und L-Glutamin). Bestimmung mit Glutamat-Dehydrogenase. In BERGMEYER,H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse, S.384 ff. Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie

BIGGS, H.G.
DOUMAS, B. 1963 Oxidative catabolism of thymine. J.Biol.Chem. 238, 2470-2473

BORNSIDE, G.H.
KALLIO, R.E. 1955 Urea-hydrolyzing bacilli.I.A physiological approach to identification. J.Bact. 71, 627-634

CAMPBELL, L.L. 1957 a Reductive degradation of pyrimidines. II. Mechanism of uracil degradation by Clostridium uracilicum. J.Bact. 73, 225-234

CAMPBELL, L.L. 1957 b Reductive degradation of pyrimidines. III. Purification and properties of dihydrouracil dehydrogenase. J.Biol.Chem. 227, 693-700

| | | |
|---|---|---|
| CAMPBELL, L.L. | 1958 | Reductive degradation of pyrimidines. IV.Purification and properties of dihydrouracil hydrase. J.Biol.Chem. 233, 1236-1240 |
| CAMPBELL, L.L. | 1960 | Reductive degradation of pyrimidines. V.Enzymatic conversion of N-carbamyl-ß-alanine to ß-alanine, carbon dioxide, and ammonia. J.Biol.Chem. 235, 2375-2378 |
| CANELLAKIS, E.S. | 1956 | Pyrimidine metabolism. I.Enzymatic pathways of uracil and thymine degradation. J.Biol.Chem. 221, 315-322 |
| CARAVACA, J.<br>GRISOLIA, S. | 1958 | Enzymatic decarbamylation of carbamyl ß-alanine and carbamyl ß-aminoisobutyric acid. J.Biol.Chem. 231, 357-365 |
| CERECEDO, L.R. | 1927 | Studies on the physiology of pyrimidines. J.Biol.Chem. 75, 661-670 |
| CERECEDO, L.R. | 1931 | Studies on the physiology of pyrimidines. IV.Further experiments on the intermediary metabolism of uracil. J.Biol.Chem. 93, 269-274 |
| CHARGAFF, E.<br>KREAM, J. | 1948 | Procedure for the study of certain enzymes in minute amounts and its application to the investigation of cytosine deaminase. J.Biol.Chem. 175, 993-994 |
| CHRISTENSEN, W.B. | 1946 | Urea decomposition as a means of differentiating Proteus and paracolon cultures from each other and from Salmonella and Shigella types. J.Bact. 52, 461-466 |
| CIHAK, A.<br>SORM, F. | 1965 | Inhibition of microbial cytosine deaminase by 5-azacytosine and 5-azauracil. Collect.Czech.chem. Comm. 30, 2137-2140 |
| CLARK, D.H.<br>COWAN, S.T. | 1952 | Biochemical methods for bacteriology. J.gen.Microbiol. 6, 187-197 |

| | | |
|---|---|---|
| DAVIES, B.D. | 1948 | Isolation of biochemically deficient mutants of bacteria by penicillin. J.Amer.chem.Soc. 70, 4267 |
| DeCICCO, B.T.<br>UMBREIT, W.W. | 1964 | Utilization of aromatic amino acids by Hydrogenomonas facilis. J.Bact. 88, 1590-1594 |
| DENNEN, D.W.<br>NIEDERPRUEM, D.J. | 1967 | Regulation of glutamate dehydrogenases during morphogenesis of Schizophyllum commune. J.Bact. 93, 904-913 |
| DeTURK, W.E. | 1955 | The adaptive formation of urease by washed suspensions of Pseudomonas aeruginosa. J.Bact. 70, 187-191 |
| DISCHE, Z. | 1962 | Color reactions of pentoses. In: Methods in carbohydrate chemistry, Bd.I, p.484 ff., Academic Press |
| ELEK, S.D. | 1948 | Rapid identification of Proteus. J.Pathol.Bact. 60, 183-192 |
| ELLIOTT, W.H. | 1953 | Isolation of glutamine synthetase and glutamotransferase from green peas. J.Biol.Chem. 201, 661-672 |
| FINK, K.<br>HENDERSON, R.B.<br>FINK, R.M. | 1952 | ß-aminoisobutyric acid in rat urine following administration of pyrimidines. J.Biol.Chem. 197, 441-452 |
| FINK, R.M.<br>FINK, K.<br>HENDERSON, R.B. | 1953 | ß-amino acid formation by tissue slices incubated with pyrimidines. J.Biol.Chem. 201, 349-355 |
| FINK, R.M.<br>CLINE, R.E.<br>KOCH, H.M.G. | 1954 | Chromatographic detection of pyrimidine reduction products: microbiological application. Fed.Proc. 13, 207-208 |
| FINK, R.M.<br>McGAUGHEY, C.<br>CLINE, R.E.<br>FINK, K. | 1956 | Metabolism of intermediate pyrimidine reduction products in vitro. J.Biol.Chem. 218, 1-7 |

| | | |
|---|---|---|
| FRITZON, P. | 1960 | Properties and assay of dihydrouracil dehydrogenase of rat liver. J.Biol.Chem. 235, 719-725 |
| GALLING, G. | 1965 | Über Ribonucleinsäure in Chlorella. III.Der Einfluß des Stickstoffmangels auf die Nucleinsäuren von Chlorella pyrenoidosa. Flora(Jena) 156, 250-254 |
| GIBBONS, R.J. DOETSCH, R.N. | 1959 | Physiological study of an obligately anaerobic ureolytic bacterium. J.Bact. 77, 417-428 |
| GOTTSCHALK, G. | 1965 | Die Verwertung organischer Substrate durch Hydrogenomonas in Gegenwart von molekularem Wasserstoff. Biochem.Z. 341, 260-270 |
| GRISOLIA, S. WALLACH, D.P. | 1955 | Enzymatic interconversion of hydrouracil and ß-ureidopropionic acid. Biochim.Biophys.Acta 18, 449 |
| GRISOLIA, S. CARDOSO, S.S. | 1957 | The purification and properties of hydropyrimidine dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta 25, 430-431 |
| HAHN, A. LINTZEL, W. | 1923 | Über das Verhalten von Pyrimidinderivaten in den Organismen. I. Einfluß von Hefe auf Pyrimidinderivate. Z.Biol. 79, 179-190 |
| HAHN, A. SCHÄFER, L. | 1925 | Über das Verhalten von Pyrimidinderivaten in den Organismen. II. Einwirkung von Bacterium coli auf Uracil und Cytosin. Z.Biol. 83, 511-514 |
| HAHN, A. HAARMANN, W. | 1926 | Über das Verhalten von Pyrimidinderivaten in den Organismen. III. Einwirkung von Hefeextrakten auf einige Aminopyrimidine. Z.Biol. 85, 275-279 |
| HAYAISHI, O. KORNBERG, A. | 1951 | Enzymatic formation of barbituric acid from uracil and of 5-methylbarbituric acid from thymine. J.Amer.chem.Soc. 73, 2975-2976 |
| HAYAISHI, O. KORNBERG, A. | 1952 | Metabolism of cytosine, thymine, uracil, and barbituric acid by bacterial enzymes. J.Biol.Chem. 197, 717-732 |

HIERHOLZER, G.
HOLZER, H. 1963 Repression der Synthese von DPN-abhängiger Glutaminsäure-Dehydrogenase in Saccharomyces cerevisiae durch Ammoniumionen. Biochem.Z. 339, 175-185

HOLZER, H.
SCHNEIDER, S. 1957 Anreicherung und Trennung einer DPN-spezifischen und einer TPN-spezifischen Glutaminsäure-Dehydrogenase aus Hefe. Biochem.Z. 329, 361-369

HOLZER, H.
BOLL, M.
CENNAMO, C. 1963 Zur Biochemie der Threonin-Desaminase aus Hefe. Angew.Chem. 75, 894-900

IWATSURU, R.
CHIKANO, M. 1923 Über die Entstehung des Uracils aus dem Cytosin durch Fäulnis. J.Biochem.(Tokyo) 2, 279-281

JACOB, F.
MONOD, J. 1961 Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J.Mol.Biol. 3, 318-356

JEFFRIES, C.D. 1964 Intracellular microbial urease. Nature 202, 930

KALTWASSER, H.
SCHLEGEL, H.G. 1966 NADH-dependent coupled enzyme assay for urease and other ammonia-producing systems. Analyt.Biochem. 16, 132-138

KALTWASSER, H. 1968 a Induktive Bildung partikelgebundener Uricase bei Hydrogenomonas H16 und anderen aeroben Bakterien. Arch.Mikrobiol. 60, 160-171

KALTWASSER, H. 1968 b Harnsäureabbau und Biosynthese der Enzyme Uricase, Glyoxylatcarboligase und Urease bei Hydrogenomonas H16. Habilitationsschrift, Göttingen

KALTWASSER, H.
KRÄMER, J. 1968 Verwertung von Cytosin und Uracil durch Hydrogenomonas facilis und Hydrogenomonas H16. Arch.Mikrobiol. 60, 172-181

KATO, K.
KOIKE, S.
YAMADA, K.
YAMADA, H.
TANAKA, S. 1962 Di- and triphosphopyrimidine nucleotide linked glutamic dehydrogenases of Piricularia oryzae and their behaviors in glutamate media. Arch.Biochem.Biophys. 98, 346-347

KLEBER, H.P.
AURICH, H.
1968
Durch Stickstoffmangel induzierte Veränderungen der mikrobiellen Synthese von Proteinen, Nukleinsäuren und B-Vitaminen.
Z.allg.Mikrobiol. 8, 9-18

KLECZKOWSKI, K.
HIORT, U.
KATING, H.
1966
Untersuchungen zum Stoffwechsel des Harnstoffs bei Mikroorganismen. IV. Adaptive Ureasebildung bei Micrococcus denitrificans Beij.
Arch.Mikrobiol. 54, 177-183

KOHLHAW, G.
DRÄGERT, W.
HOLZER, H.
1965
Parallel-Repression der Synthese von Glutamin-Synthetase und DPN-abhängiger Glutamat-Dehydrogenase in Hefe.
Biochem.Z. 341, 224-238

KÖNIG, C.
KALTWASSER, H.
SCHLEGEL, H.G.
1966
Die Bildung von Urease nach Verbrauch der äußeren N-Quelle bei Hydrogenomonas H16.
Arch.Mikrobiol. 53, 231-241

KÖNIG, C.
SCHLEGEL, H.G.
1967
Oscillationen der Ureaseaktivität von Hydrogenomonas H16 in statischer Kultur.
Biochim.Biophys.Acta 139, 182-185

KRÄMER, J.
KALTWASSER, H.
SCHLEGEL, H.G.
1967
Die Bedeutung der Ureaserepression für die taxonomische Klassifizierung von Bakterien.
Zbl.Bakt.II 121, 414-423 und
Zbl.Bakt. I 205, 88-89

KREAM, J.
CHARGAFF, E.
1950
Cytosine deaminase of yeast.
Fed.Proc. 9, 192

KREAM, J.
CHARGAFF, E.
1952 a
Procedures for the study of purine and pyrimidine deaminases in small amounts.
J.Amer.chem.Soc. 74, 4274-4277

KREAM, J.
CHARGAFF, E.
1952 b
On the cytosine deaminase of yeast.
J.Amer.chem.Soc. 74, 5157-5160

KUHLHANEK, M.
SVATEK, E.
TADRA, M.
1965
Microbial decarboxylation of orotic acid to uracil.
Folia Microbiol.(Prag)
10 (2), 142-144

LEDERBERG, J.
ZINDER, N.
1948
Concentration of biochemical mutants of bacteria with penicillin.
J.Amer.chem.Soc. 70, 4267-4268

LEDERBERG, J.
LEDERBERG, E.M. 1952 Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J.Bact. 63, 399-406

LeJOHN, H.B.
SUZUKI, I.
WRIGHT, J.A. 1968 a Glutamat dehydrogenase of Thiobacillus novellus. J.Biol.Chem. 243, 118-128

LeJOHN, H.B.
McCREA, B.E. 1968 b Evidence for two species of glutamat dehydrogenases in Thiobacillus novellus. J.Bact. 95, 87-94

LIEBERMANN, I.
KORNBERG, A. 1953 Enzymic synthesis and breakdown of a pyrimidine, orotic acid. 1. Dihydro-orotic dehydrogenase. Biochim.Biophys.Acta 12, 223-234

LIEBERMANN, I.
KORNBERG, A.
SIMMS, E.S. 1955 Enzymatic synthesis of pyrimidine nucleotides. Orotidine-5'-phosphate and uridine-5'-phosphate. J.Biol.Chem. 215, 403-415

LIPMANN, F.
TUTTLE, L.C. 1945 A spezific micromethod for the determination of acyl phosphates. J.Biol.Chem. 159, 21-28

LOCHMANN, I.R. 1965 Umwandlung von Nucleinsäurebasen in einem zellfreien Hefeextrakt. Z.Naturforsch. 20 b, 1134

LORING, H.S. 1955 Hydrolysis of nucleic acids and procedures for the direct estimation of purine and pyrimidine fractions by absorption spectrophotometry. In CHARGAFF, E., and J.N. DAVIDSON: The nucleic acids, Vol.1,p.201 ff., New York: Academic Press

MAGANA-PLAZA, I.
RUIZ-HERRERA, J. 1967 Mechanisms of regulation of urease biosynthesis in Proteus rettgeri. J.Bact. 93, 1294-1301

MANDELSTAM, J. 1957 Turnover of protein in starved bacteria and its relationship to the induced synthesis of enzyme. Nature 179, 1179-1181

MANDELSTAM, J. 1958 a The free amino acids in growing and non-growing populations of Escherichia coli. Biochem.J. 69, 103-110

| | | |
|---|---|---|
| MANDELSTAM, J. | 1958 b | Turnover of protein in growing and non-growing populations of Escherichia coli. Biochem.J. 69, 110-119 |
| MAZUS, B.<br>BUCHOWIZC, J. | 1966 | Dihydropyrimidinase activity in pea plants. Acta Biochim.Polonica 13, 267-272 |
| MIDDELHOVEN, W.J. | 1968 | The derepression of arginase and of ornithine transaminase in nitrogen-starved baker's yeast. Biochim.Biophys.Acta 156, 440-443 |
| MOKRASCH, L.C.<br>GRISOLIA, S. | 1958 | Incorporation of hydropyrimidine derivatives in ribonucleic acid with liver preparations. Biochim.Biophys.Acta 27, 226-227 |
| MOKRASCH, L.C.<br>GRISOLIA, S. | 1959 | Contribution of hydrouracil and its derivatives to pyrimidine biosynthesis. I.Scope of contribution and some properties of the incorporating system. Biochim.Biophys.Acta 33, 444-451 |
| MONOD, J. | 1959 | Biosynthese eines Enzyms. Information, Induktion, Repression. Angew. Chemie 71, 685-708 |
| NEIDHARDT, F.C.<br>MAGASANIK, B. | 1960 | Studies on the role of ribonucleic acid in the growth of bacteria. Biochim.Biophys.Acta 42, 99-116 |
| NEIDHARDT, F.C. | 1962 | Role of amino acids in regulating RNA formation. Biochem.Biophys.Res.Commun. 7, 361-365 |
| NEIDHARDT, F.C. | 1966 | Roles of amino acid activating enzymes in cellular physiology. Bact.Rev. 30, 701-719 |
| NEWMARK, P.<br>FUJIMOTO, Y. | 1959 | Nucleic acids of nitrogen deficient Chlorella pyrenoidosa. Fed. Proc. 18, 293 |
| NITSCH, H.<br>KUTZNER, H.J. | 1968 | Ureaseaktivität bei Streptomyceten. Z. Naturforsch. 23 b, 565 |

OLSON, J.A.
ANFINSEN, C.B. 1952 The crystallization and characterization of L-glutamic acid dehydrogenase.
J.Biol.Chem. 197, 67-79

PITHOVA, P.
SORM, F. 1963 Influence of some derivatives and structural analogues of pyrimidine and purine bases on the degradation of uracil.
Collec.Czech.Chem.Commun. 28(11), 2977-2982

RAMALEY, R.F.
BERNLOHR, R.W. 1966 Postlogarythmic phase metabolism of sporulating organisms.
III. Breakdown of arginine to glutamic acid.
Arch.Biochem.Biophys. 117, 34-43

REH, M. 1967 Regulation der Synthese von Isoleucin und Valin durch Hydrogenomonas H16.
Diss. Göttingen

LA RIVIÈRE, J.W.M. 1958 On the microbial metabolism of the tartaric acid isomers.
Diss. Delft

SANWAL, B.D.
LATA, M. 1961 The occurrence of two different glutamic dehydrogenases in Neurospora.
Canad.J.Microbiol. 7, 319-328

SANWAL, B.D. 1961 Diphosphopyrimidine nucleotide and triphosphopyrimidine nucleotide linked glutamic dehydrogenases of Fusarium.
Arch.Biochem.Biophys. 93, 377-386

SANWAL, B.D.
LATA, M. 1962 Concurrent regulation of glutamic acid dehydrogenases of Neurospora.
Arch.Biochem.Biophys. 97, 582-588

SCHAECHTER, M.
MAALOE, O.
KJELDGAARD, N.O. 1958 Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of Salmonella typhimurium.
J.gen.Microbiol. 19, 592-606

SCHANKER, L.S.
TOCCO, D.J. 1962 Some characteristics of the pyrimidine transport process of the small intestine.
Biochim.Biophys.Acta 56, 469-473

SCHLEGEL, H.G.
KALTWASSER, H.
GOTTSCHALK, G.
1961
Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen.
Arch. Mikrobiol. 38, 209-222

SENECA, H.
PEER, P.
NALLY, R.
1962
Microbial urease.
Nature 193, 1106-1107

STENT, G.S.
BRENNER, S.
1961
A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis.
Proc.nat.Acad.Sci.USA
47, 2005-2014

STEWART, D.J.
1965
The urease activity of fluorescent Pseudomonads.
J.gen. Microbiol. 41, 169- 174

STUART, C.A.
v. STRATUM, E.
RUSTIGAN, R.
1945
Further studies on urease production by Proteus and related organisms.
J.Bact. 49, 437-444

WALLACH, D.P.
GRISOLIA, S.
1957
The purification and properties of hydropyrimidine hydrase.
J.Biol.Chem. 226, 277-288

WANG, T.P.
LAMPEN, J.O.
1952
Metabolism of pyrimidines by a soil bacterium.
J.Biol.Chem. 194, 775-783

WOOLFOLK, C.A.
SHAPIRO, B.
STADTMAN, E.R.
1966
Regulation of glutamine synthetase.
I.Purification and properties of glutamine synthetase from Escherichia coli.
Arch.Biochem.Biophys. 116, 177-192

Herrn Prof. Dr. H.G.Schlegel danke ich für die Überlassung des Themas und für sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Dr. H.Kaltwasser danke ich für die mir stets gewährte Unterstützung.

## Lebenslauf

Am 28.April 1941 wurde ich als Sohn der Eheleute Johann Krämer und Lotte Krämer, geb. Sinow, in Hamm/Westf. geboren. Nach Beendigung der Grundschule in Hamburg-Bergedorf und in Berlin-Tegel besuchte ich ab 1954 das Hansa-Gymnasium in Hamburg-Bergedorf und anschließend das Gymnasium Uhlenhorst-Barmbek in Hamburg, an dem ich 1962 die Reifeprüfung ablegte. Im gleichen Jahr begann ich mit dem Studium der Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg/Br. Im Sommersemester 1963 setzte ich das Studium an der Georg-August-Universität in Göttingen fort. Seit dem Sommersemester 1966 arbeite ich im Institut für Mikrobiologie an der vorliegenden Dissertation.

Bönecke-Druck - Clausthal-Zellerfeld 29